DIE CHEMISCHE NATUR DER SELENHALTIGEN KOMPONENTE VON GLUTATHIONPEROXIDASE AUS RINDERERYTHROZYTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Kerner
aus Bielefeld

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0015

DIE CHEMISCHE NATUR DER SELENHALTIGEN KOMPONENTE VON GLUTATHIONPEROXIDASE AUS RINDERERYTHROZYTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Bernhard Kerner
aus Bielefeld

1978

Tag der mündlichen Prüfung: 5.Mai 1978

1. Berichterstatter: Univ.Doz. Dr. Albrecht Wendel

2. Berichterstatter: Prof.Dr. Ulrich Weser

Dekan: Prof. Dr. W.Zeil

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A b s t r a c t

Bernhard Kerner

Die chemische Natur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten

Dem Selenoenzym Glutathionperoxidase kommt eine große Bedeutung bei der Reparatur oxidativer Schädigungen von Membranen zu. Zur Aufklärung der chemischen Natur der selenhaltigen Komponente wurden zunächst ein halbtechnisches Isolationsverfahren für das Enzym, sowie eine fluorometrische Bestimmungsmethode für Selen (Erfassungsgrenze 5 ng) entwickelt. Das Enzym wurde mit reduzierenden, denaturierenden, oxidierenden und alkylierenden Reagenzien umgesetzt. Reduziertes und alkyliertes Enzym wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie und der Röntgenphotoelektronenspektroskopie untersucht.

Die Stöchiometrie der Bindung von Halogenessigsäurederivaten und speziell der zeitliche Verlauf der Inhibition von Glutathionperoxidase durch Chlorazetat wurde untersucht.

In den Hydrolysaten von oxidierter und von ^{14}C-carboxymethylierter Glutathionperoxidase wurden ninhydrinpositive, bzw. o-Phthaldialdehydpositive und selenhaltige radioaktive Produkte nachgewiesen, die auch bei entsprechender Behandlung von Selenocystein entstehen.

Aus den vorgelegten Befunden wird geschlossen, daß Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten als selenhaltige Komponente Selenocystein enthält.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Anleitung von Herrn Universitätsdozent Dr.A.Wendel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen (Direktor: Prof.Dr.Dr. G. Weitzel) durchgeführt.

Herrn Dr.A.Wendel danke ich für seine sorgfältige Betreuung bei Planung, Durchführung und Diskussion der Untersuchungen.

Insbesondere bin ich zu Dank verpflichtet:
Frau Dr. A.M.Fretzdorff und Herrn Dr.W.Stock für die Durchführung von Aminosäureanalysen,
Frl.M.Fausel, Frl.cand.biochem.S.Feuerstein und M.Mader für die Durchführung von Selenbestimmungen und die Mitarbeit bei vielen Experimenten,
Frl.cand.biochem. S.Heidinger und den Herren cands.biochem. H.D.Baum, W.Jung, W.Rollinger und K.H.Sellinger für die Mitarbeit bei der Isolierung von Glutathionperoxidase,
Herrn dipl.biochem.W.Pilz für die Aufnahme von Röntgenphotoelektronenspektren,
Herrn E.Eichele und den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt des Physiologisch-chemischen Institutes für die Anfertigung nicht käuflicher Geräte.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

A man learns to skate by
staggering about making
a fool of himself. Indeed
he progresses in all things
by resolutely making a fool
of himself.

G.B.Shaw

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Enzym Glutathionperoxidase	1
1.1.1.	Funktion im Zellstoffwechsel	1
1.1.2.	Molekulare Daten und Reaktionsmechanismus	3
1.2.	Das Element Selen und seine biologischen Wirkungen	4
1.2.1.	Die Entdeckung des Selens und seiner toxischen Wirkungen	4
1.2.2.	Das Element Selen als essentielles Spurenelement	5
1.3.	Das Enzym Glutathionperoxidase als Selenoenzym	6
1.4.	Selenoproteine	7
2.	Ziel der Arbeit	9
3.	Material und Methoden	1o
3.1.	Material	1o
3.1.1.	Chemikalien	1o
3.1.2.	Radiochemikalien	1o
3.1.3.	Materialien für die Chromatographie	1o
3.1.4.	Geräte	1o
3.2.	Methoden	12
3.2.1.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase	12
3.2.2.	Proteinbestimmungen	12
3.2.3.	Bestimmung von Selen	12
3.2.4.	Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten	13
3.2.5.	Behandlung von Glutathionperoxidase mit starken reduzierenden Agenzien	15
3.2.5.1.	Behandlung mit Natriumdithionit	15
3.2.5.2.	Behandlung mit Natrium- und Kaliumtetraboranat	15

3.2.6. Behandlung von Glutathionperoxidase mit denaturierenden Agenzien in Gegenwart starker Reduktionsmittel 16
3.2.6.1. Behandlung mit Natriumdodecylsulfat in Anwesenheit von Dithiothreitol 16
3.2.6.2. Behandlung mit Harnstoff in Gegenwart von Glutathion 16
3.2.6.3. Behandlung mit Harnstoff in Gegenwart von Kaliumtetraboranat 17
3.2.7. Behandlung mit Perameisensäure und Totalhydrolysen 17
3.2.7.1. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit Perameisensäure 17
3.2.7.2. Modifizierung von Referenzsubstanzen mit Perameisensäure 17
3.2.7.3. Saure Totalhydrolyse von Proben aus 3.2.7.1. und 3.2.7.2. 17
3.2.7.4. Enzymatische Totalhydrolyse von Proben aus 3.2.7.1. und 3.2.7.2. 18
3.2.7.5. Automatische Aminosäureanalyse der Hydrolysate 18
3.2.8. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit alkylierenden Substanzen 19
3.2.8.0. Vorbemerkung 19
3.2.8.1. Bindung von radioaktiv markierten Halogenessigsäurederivaten an Glutathionperoxidase 19
3.2.8.2. Wirkung von Cyanid auf die Stöchiometrie der Alkylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat 2o
3.2.8.3. Hemmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase durch Chlorazetat 2o
3.2.8.4. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat nach vorheriger Jodazetamidbehandlung 2o
3.2.8.5. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase nach vorheriger Reduktion mit Kaliumtetraboranat 21

3.2.8.6. Saure Totalhydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase 21
3.2.8.7. Enzymatische Hydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase 21
3.2.8.8. Automatische Aminosäureanalyse von Hydrolysaten carboxymethylierter Glutathionperoxidase 22
3.2.9. Darstellung von carboxymethylierten Aminosäuren 23
3.2.9.1. Reindarstellung von Se-Carboxymethylselenocystein 23
3.2.9.2. Darstellung von carboxymethylierten Aminosäuren unter den in 3.2.8.5. beschriebenen Bedingungen 23

4. Ergebnisse 24
4.1. Die quantitative Bestimmung von Selen in organischem Material 24
4.2. Isolation von Glutathionperoxidase im halbtechnischen Maßstab 27
4.2.1. Methodische Verbesserungen 28
4.2.2. Anreicherungstabelle einer Isolierung 29
4.3. Wirkung starker reduzierender Agenzien auf Glutathionperoxidase 29
4.3.1. Wirkung von Natriumdithionit 29
4.3.2. Wirkung von Tetraboranaten 29
4.4. Wirkung von denaturierenden Agenzien auf Glutathionperoxidase unter reduzierenden Bedingungen 31
4.4.1. Dissoziation von Glutathionperoxidase in Untereinheiten durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat in Gegenwart von Dithiothreitol 31
4.4.2. Behandlung von Glutathionperoxidase mit Harnstoff in Gegenwart von Glutathion bzw. Kaliumtetraboranat 33

4.5. Totalhydrolysen von mit Perameisensäure oxidierter Glutathionperoxidase 33
4.5.1. Saure Hydrolyse mit 6 N Salzsäure 33
4.5.2. Enzymatische Hydrolyse mit einer Kombination proteolytischer und peptidolytischer Enzyme 36
4.5.3. Modifizierung von Aminosäuren mit Perameisensäure 36
4.6. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit alkylierenden Agenzien 38
4.6.1. Stöchiometrie der Bindung von ^{14}C-markierten Halogenessigsäurederivaten 38
4.6.2. Wirkung einer Cyanidvorbehandlung auf die Stöchiometrie der Bindung von 1-^{14}C markiertem Chlorazetat an reduzierte Glutathionperoxidase 39
4.6.3. Hemmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat 40
4.6.4. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat nach Jodazetamidvorbehandlung 42
4.6.5. Totalhydrolysen von carboxymethylierter Glutathionperoxidase 46
4.6.5.1. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit 1-^{14}C-Chlorazetat 46
4.6.5.2. Saure Totalhydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase 46
4.6.5.3. Enzymatische Hydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase 49
4.6.5.4. Carboxymethylierung von Referenzsubstanzen mit Chlorazetat 49
5. Diskussion 50
5.1. Zur Bestimmung von Selen in organischem Material 50
5.2. Probleme der Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten im halbtechnischen Maßstab 51

5.3.	Reduktive Behandlung von Glutathionperoxidase	53
5.4.	Denaturierung von Glutathionperoxidase in Gegenwart starker Reduktionmittel	54
5.5.	Die Oxidation von Glutathionperoxidase mit Perameisensäure und die Freisetzung der Oxidationprodukte der selenhaltigen Komponente durch Totalhydrolyse	55
5.6.	Zur Modifizierung von Glutathionperoxidase mit Halogenessigsäurederivaten	57
5.6.o.	Zum Problem des Arbeitens mit Selenverbindungen der Oxidationsstufen -1 und -2	57
5.6.1.	Zur Bindung von Halogenessigsäurederivaten an Glutathionperoxidase	58
5.6.2.	Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase durch Behandlung mit Chlorazetat	6o
5.6.3.	Spektroskopische Untersuchungen an carboxymethylierter Glutathionperoxidase	6o
5.6.4.	Hydrolysen und Aminosäureanalysen von carboxymethylierter Glutathionperoxidase	62
5.7.	Vorstellung zur chemischen Natur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase	64
6.	Zusammenfassung	65
	Literaturverzeichnis	66

A B K Ü R Z U N G E N

GSH	Glutathion
GSSG	Diglutathiondisulfid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (red.)
GR	Glutathionreduktase
G-6-P-DH	Glukose-6-phosphat-dehydrogenase
GSH-Px	Glutathionperoxidase
MOPS	Morpholino-3-propansulfonsäure
TES	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRAP	Triäthanolaminhydrochlorid

1. EINLEITUNG

1.1. Das Enzym Glutathionperoxidase

1.1.1. Funktion im Zellstoffwechsel

Im Jahre 1957 wurde von MILLS [1] ein Protein aus Rindererythrozyten beschrieben, welches den Abbau von Wasserstoffperoxid unter Verbrauch von Glutathion katalysiert. MILLS schrieb diesem hitzelabilen Faktor die Funktion zu, Hämoglobin vor einem oxidativen Angriff des Wasserstoffperoxids zu schützen.
Nach der Anreicherung des Enzyms konnte er zusätzlich zeigen, daß die katalatische Aktivität des Erythrozyten nicht an das gleiche Protein gebunden ist wie die Aktivität der Glutathionperoxidase [2]. COHEN und HOCHSTEIN [3] vertraten dann im Jahre 1963 die Meinung, daß der Glutathionperoxidase bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid eine größere Bedeutung zukommt als der Katalase - daß die Glutathionperoxidase sozusagen die erste Verteidigungslinie des Organismus gegen oxidative Angriffe darstellt.
Erst im Jahre 1968 entdeckten LITTLE und O'BRIEN [4] die wohl wichtigste Funktion der Glutathionperoxidase: die Reduktion von Lipidhydroperoxiden. Die Bildung dieser für die Zelle deletären Stoffe erfolgt nach Oxidation von ungesättigten Membranlipiden und führt rasch zu funktionellen Störungen der betroffenen Membran.
Alle Lebewesen, die ihre Energie aus der Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Wasser gewinnen, müssen dem Problem begegnen, daß neben dieser erwünschten Reaktion auch hochreaktive Zwischenprodukte, wie Singulettsauerstoff, Superoxidradikale und Peroxide entstehen [5]. Es ist bekannt, daß Wasserstoffperoxid als Produkt einiger enzymatischer Reaktionen auftritt [6,7]. Ein beachtlicher Teil des Wasserstoffperoxids wird aus der Dismutation von Superoxid gewonnen [5,6,8], die sowohl spontan verläuft wie auch über das Enzym Superoxiddismutase bewerkstelligt wird. Dieses hat zur Folge, daß Wasserstoffperoxid und Superoxid

gleichzeitig in der Zelle anwesend sein und folgende Reaktionen durchführen können:

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2^*$$
$$H_2O_2 + O_2^- + H^+ \longrightarrow OH + O_2 + H_2O$$
$$OH + O_2^- \longrightarrow O_2^* + OH^-$$

O_2^- = Superoxidanion
O_2^* = Singulettsauerstoff
OH = Hydroxylradikal

Die hohe Reaktivität der verschiedenen Sauerstoffspezies und -verbindungen ist die Grundlage sehr wichtiger biochemischer Reaktionen, wie z.B. die Hydroxylierung [9], die Biosynthese von Thyroxin [1o], die α-Oxidation von Fettsäuren [11], die Oxidation von Alkoholen [12] und Biolumineszenzen [13].
Die Kehrseite dieser Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies ist jedoch der unspezifische Angriff besonders oxidationsempfindlicher Strukturen der Zelle.
Zwar stellt die Zelle mit dem Enzym Superoxiddismutase einen guten Präventivmechanismus gegen Singulettsauerstoff und Superoxidradikale zur Verfügung:

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad [14,15]$$
$$O_2^* \longrightarrow O_2 \qquad [\ 8,16]$$

doch bereits eingetretene Schädigungen durch Peroxidierung von Lipiden müssen auf andere Weise behoben werden.
Zu diesem Zweck bietet sich die Glutathionperoxidase mit ihrer breiten Spezifität gegenüber Peroxidsubstraten an.
In der von ihr katalysierten Reaktion

$$Lip\text{-}OOH + 2\ GSH \longrightarrow Lip\text{-}OH + GSSG + H_2O$$

werden die gefährlichen Peroxidationsprodukte in für die Zelle harmlose Hydroxyfettsäuren umgewandelt.

1.1.2. Molekulare Daten und Reaktionsmechanismus des Enzyms

In einer Serie von Arbeiten untersuchten FLOHÉ und Mitarbeiter [17-23] die molekularen Eigenschaften von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten und klärten zusätzlich den kinetischen Mechanismus der Reaktion auf [24]. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Molekulare Eigenschaft		Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten
Molekulargewicht		84 000
Untereinheiten	Anzahl	4
	Molekulargewicht	21000
Selengehalt [Grammatom/Mol Enzym]		4

Tabelle 1: Molekulare Eigenschaften von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten

Daraus und aufgrund einer "active site titration" mit p-Chlor mercuribenzoat sowie des Fehlens klassischer prosthetischer Gruppen formulierten FLOHÉ und Mitarbeiter ein Modell der enzymatischen Katalyse als einen Prozeß aus mehreren Redoxreaktionen [20]. In Übereinstimmung mit den kinetischen Befunden [24] sieht dieses Modell keine beständigen Enzym-Substrat-Komplexe vor (Abb.1).

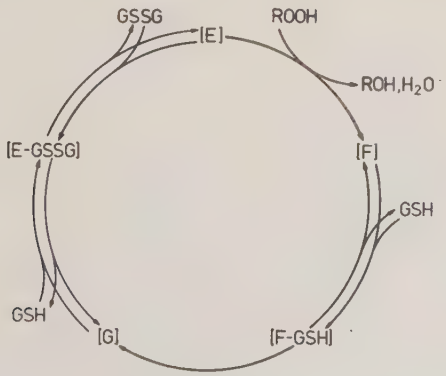


Abb.1: Reaktionsmechanismus von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten

1.2. Das Element Selen und seine biologischen Wirkungen

1.2.1. Die Entdeckung des Selens und seiner toxischen Wirkungen

Das Element Selen, dessen Verbindungen als stark toxisch gelten, wurde im Jahre 1817 von den Schweden Berzelius und Gahn entdeckt. Die erstmalige Darstellung einer Organoselenverbindung, dem Äthylselenol, erfolgte im Jahre 1847 [25], doch Verbindungen des Selens blieben lange Zeit eine Laborkuriosität.

Obwohl bereits Marco Polo im Jahre 1295 in den Steppen Turkestans Vergiftungen von Pferden beobachtete, die wohl auf mit dem Futter aufgenommene Überdosen von Selen zurückzuführen waren, beginnen systematische Untersuchungen der Toxizität von Selen mit der Besiedlung des Westens der USA und der Nutzung des Landes zur Viehzucht im vorigen Jahrhundert. Bereits kurz nach ihrer Ankunft im Bundesstaat Nebraska berichteten viele Siedler über Krankheitssymptome bei ihrem Vieh, die auch der Armeearzt Madison bei Armeepferden diagnostiziert hatte. Man führte die Krankheit, die sich durch allgemeinen Vitalitätsverlust, Anämien, Leberatrophien und -zirrhose zeigte, zunächst auf alkalische Bestandteile des Wassers zurück und bezeichnete sie demzufolge als "alkali disease".

Erst im Laufe der dreißiger Jahre dieses Jahrhunderts konnte die Ursache für diese Krankheit aufgeklärt werden. Untersuchungen brachten ans Licht, daß die Tiere Pflanzen gefressen hatten, die in der Lage sind, Selen in organisch gebundener Form zu akkumulieren. Man unterscheidet zwei Arten der Vergiftung [26]:

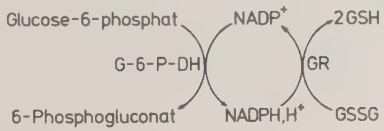
a) die chronische, bereits beschriebene "alkali disease"
b) die akute, als "blind stagger disease" bekannte Form mit Symptomen wie Blindheit, Speichelfluß, abdominalen Krämpfen, Paralyse und Letalität.

Läßt man Weizen auf selenhaltigen Böden wachsen, so findet man anschließend Selen in der Proteinfraktion der Weizenkörner [27,28]. Entfernt man die Proteinfraktion, so verliert das Getreide seine Toxizität [29]. In Hydrolysaten von Pflanzen mit hohen Selengehalten konnten später die

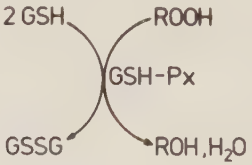
Aminosäuren Selenocystin [3o], Selenomethionin [31], Se-methyl-selenocystein [32] und Selenocystathionin[32] nachgewiesen werden.

1.2.2. Das Element Selen als essentielles Spurenelement bei höheren Tieren

Hatte man bisher nur die toxischen Wirkungen von Selen untersucht, so eröffneten im Jahre 1957 die Befunde von SCHWARZ und FOLTZ [33,34], daß Selen die aktive Komponente eines sogenannten Faktors 3 ist , neue Perspektiven. Diese, bis heute nicht charakterisierte Verbindung verhindert die Ausbildung einer Lebernekrose bei Ratten, die mit einer Vitamin E-, cystin- und selenarmen Diät aus Torulahefe gefüttert wurden. Die pathologischen Zustände konnten verhindert werden, wenn die Torulahefe durch amerikanische Brauhefe ersetzt wurde. Letztere enthält zwar auch wenig Cystin und Vitamin E, ist dafür aber reich an Faktor 3.
Man fand, daß auch einige andere Vitamin E-Mangelerscheinungen wie die "exudative diathesis" bei Küken durch Applikation von Faktor 3 oder sogar nur Selenit zu beheben waren [35]. Allen beobachteten Mangelerscheinungen war gemeinsam, daß sie auf nekrotischen Veränderungen des Gewebes basierten.
Spätere Unteruchungen von ROTRUCK und Mitarbeitern [36] zeigten, daß Selengaben zum Schutz von Rattenerythrozyten gegen oxidative Schädigungen beitragen und daß diese Wirkung von der Glukosezufuhr abhängig ist. Die Wirkung von Glukose beim Schutz von Erythrozyten gegen Hämolyse und die Oxidation des Hämoglobins war bereits von COHEN und HOCHSTEIN [3] beschrieben worden. Die Autoren erklärten sie so, daß über eine Kopplung der Enzyme Glukose-6-phosphat-dehydrogenase und Glutathionreduktase ein bestimmter Spiegel an reduziertem Glutathion aufrechterhalten wird.



Glutathion selbst kann die Sulfhydrylgruppen von Hämoglobin vor Oxidation schützen, wichtiger ist aber sein Beitrag in der Reaktion von Glutathionperoxidase, welche Wasserstoffperoxid und Lipidhydroperoxide zu weit weniger reaktiven Verbindungen metabolisiert.



ROTRUCK und Mitarbeiter [37] fanden, daß der Glutathionspiegel von Selenmangelerythrozyten höher war als der von normalen roten Blutkörperchen. Sie schlossen daraus, daß der metabolische Defekt seine Ursache nicht im homöostatischen Mechanismus der Aufrechterhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion haben müsse, sondern in der Utilisation von Glutathion zu suchen sei.

1.3. Das Enzym Glutathionperoxidase als Selenoenzym

Die genannte Arbeitsgruppe konzentrierte ihre Untersuchungen auf das Enzym Glutathionperoxidase und fand nach der Applikation von 75-Se-Selenit bei Ratten, daß die Radioaktivität mit einer proteingebundenen Glutathionperoxidaseaktivität auf einem Anionenaustauscher cochromatographierte [37]. Das Selen war von dem Protein durch Dialyse nicht zu trennen, gleichzeitig konnte die enzymatische Aktivität von Selenmangelerythrozyten durch Inkubation mit Selenit nicht wiederhergestellt oder verbessert werden.
Die Folgerung, daß Selen ein integraler Bestandteil des Enzyms Glutathionperoxidase sein müsse, wurde kurz darauf von FLOHÉ und Mitarbeitern bewiesen. Sie zeigten mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse, daß von ihnen aus Rindererythrozyten isoliertes und bis zur Kristallisation gereinigtes Enzym 4 Grammatome Selen pro Mol Enzym (Mol.gew. 84ooo) enthält [38].

Alle Versuche, die selenhaltige Komponente des Enzyms zu isolieren und zu charakterisieren, scheiterten bisher. Zwar gelang es GÜNZLER [39], im sauren Hydrolysat von Glutathionperoxidase die Selenoaminosäuren Selenocystin und Selenomethionin nachzuweisen, doch die hohohen Selenverluste während der Hydrolyseprozedur und weitere selenhaltige Fraktionen im Chromatogramm stellten den Wert dieser Ergebnisse in Frage.
Versuche von LADENSTEIN [4o] ein selenhaltiges tryptisches Peptid der Glutathionperoxidase zu isolieren, scheiterten ebenfalls an hohen Selenverlusten.
Erste Hinweise, wie man zu einem Bild über die Natur der chemischen Bindung von Selen in Glutathionperoxidase kommen kann, lieferten die Untersuchungen von WENDEL und Mitarbeitern [41] im Jahre 1975. Es wurde mit Hilfe der Röntgenphotoelektronenspektroskopie gezeigt, daß das proteingebundene Selen einen substratinduzierten Redoxwechsel durchläuft. Hierbei könnte aufgrund der von WESER et al. [42] durchgeführten Modelluntersuchungen dem Selen in der reduzierten Enzymspezies die Oxidationsstufe 0, -1 oder -2 zugeordnet werden, nach Oxidation wird wahrscheinlich die Oxidationsstufe +4 erreicht.
Weitere Hinweise auf die Natur der selenhaltigen Komponente lassen sich aus Betrachtungen anderer Selenoproteine gewinnen.

1.4. Selenoproteine

Das Enzym Glutathionperoxidase ist keineswegs das einzige natürlich vorkommende Selenoprotein. Schon im Jahre 1954 zeigte PINSENT [43], daß Selen ein essentieller Wuchsstoff für Bakterien ist und sogar inkorporiert wird. Erste Hinweise stammen von SHUM und MURPHY [44], die zeigten, daß das Molybdänenzym Formiatdehydrogenase, z.B. von E.coli und Clostridium sticklandii in seiner Aktivität vom Selengehalt des Nährmediums abhängt und daß Selen in dieses Protein aufgenommen wird.

Ein weiteres Enzymsystem, welches in seiner Funktion auf Selen angewiesen ist, stellt der Glycinreduktase-komplex von Clostridium sticklandii dar. In einer Serie von Arbeiten zeigte die Arbeitsgruppe um T.C. STADTMAN [45-48], daß dieser Enzymkomplex, welcher die reduktive Desaminierung von Glycin katalysiert, einen hitzestabilen Faktor mit einem Molekulargewicht von ca. 12ooo enthält. Dieses saure Protein kann nur unter Zusatz reduzierender Agenzien in reiner Form isoliert werden und enthält wie TURNER und STADTMAN [48] nachwiesen 1 Grammatom Selen pro Mol des Proteins.
Inzwischen wurde gezeigt, daß das Selen in Form von Selenocystein in das Enzym integriert ist [49,5o].

2. Z I E L D E R A R B E I T

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, die chemische Natur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase zu charakterisieren. Um derartige proteinchemische Studien zu betreiben, sind zunächst zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Es muß eine Isolierungsmethode für das Enzym aus Rindererythrozyten erarbeitet werden, die in vertretbarer Zeit größere Mengen hochreinen Enzyms liefert.
2. Ein Verfahren zur Bestimmung von Selen in organischem Material mit einer Erfassungsgrenze von besser als 1o ng ist zu entwickeln.

Auf dieser Grundlage sollen Experimente unternommen werden, die das Ziel haben, die selenhaltige Komponente zu stabilisieren und zum Zwecke ihrer Identifizierung zu isolieren. Stabile Derivate werden erwartet nach Oxidation oder nach alkylierender Behandlung des reduzierten Enzyms. Die Freisetzung der stabilen Derivate kann durch denaturierende oder hydrolytische Behandlung des Proteins erfolgen.

Zur Identifizierung der selenhaltigen Komponente eignet sich die Ionenaustauschchromatographie und physikalisch-chemische Methoden.

3. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

2,3 Diaminonaphthalin, Aminomalonsäure, Chloressigsäure,puriss., Carboxymethylcystein
-Firma FLUKA , Neu-Ulm
Selenocystin, Selenomethionin
-Firma SIGMA , München
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), TRITON-X-100,Laktose, p.a., Pronase
-Firma SERVA , Heidelberg
Aminopeptidase M, Glutathionreduktase, NADPH,TRAP
-Firma Boehringer , Mannheim
Prolidase -Firma MILES , Slough (England)
Alle übrigen Chemikalien waren pro analysi-Substanzen der Firma MERCK , Darmstadt.

3.1.2. Radiochemikalien

1-^{14}C - Chloressigsäure , spez.Radioakt.:49.24 mCi/mmol
-Firma New England Nuclear , Langen
2-^{14}C - Jodessigsäure , spez. Radioakt.: 57 mCi/mmol
1-^{14}C - Jodazetamid , spez. Radioakt.: 57 mCi/mmol
-Firma Amersham Buchler, Braunschweig

3.1.3. Materialien für die Chromatographie

Sephadex G-25 fine + coarse , Sephadex G-150 fine, DEAE-Sephadex A-50, PD 2 -Fertigsäulen(G-25 fine)
-Firma Deutsche Pharmacia, Freiburg
Amberlite XAD-8 -Firma SERVA, Heidelberg

3.1.4. Geräte

Spectronic UV-210A Split beam photometer
-Firma Bausch und Lomb, München
Filterfluorometer AMINCO J4-7439
mit Primärfilter 7-60 Corning und Sekundärfilter 4-7118 Wratten -Firma COLORA , Lorch
Röntgenphotoelektronenspektrometer VARIAN V-IEE 15 mit VARIAN 620L 8K Computer
-Firma VARIAN, Darmstadt

Aminosäureanalysator UNICHROM
-Firma BECKMAN Instruments, München
Probengeber für Aminosäureanalysator
Glove box
Präparativer Fraktionssammler TOSIME
-Feinmechanische Werkstatt des Physiologisch-chemischen Institutes der Universität Tübingen
Separator -Firma Westfalia,
Hohlfaserdialysatoren
-Firma Cordis Dow
Hohlfaserkonzentratoren verschiedener Größen
-Firma BERGHOF, Tübingen
Alle übrigen verwendeten Geräte entstammten der üblichen Laborausrüstung.

3.2. Methoden

3.2.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase

Die Bestimmung erfolgte in den meisten Fällen nach der von GÜNZLER et al. [51] vorgeschlagenen gekoppelten Testmethode. Nur in einigen Fällen wurde der von FLOHÉ und BRAND [52] vorgeschlagene polarographische Test angewendet [52].

3.2.2. Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden für gereinigte Glutathionperoxidase (spez. Aktivität $\geq$ 5o U/mg) durch Messung der Extinktion bei 28o nm mit Hilfe des von GÜNZLER [39] ermittelten Faktors (1 Extinktionseinheit $\triangleq$ 1.35 mg/ml) bestimmt. In anderen Fällen wurden die Methoden von LOWRY et al. [53] und die von HEINZEL [54] angewendet.

3.2.3. Bestimmung von Selen

Die Bestimmung erfolgte fluorometrisch durch Reaktion mit 2,3-Diaminonaphthalin [55], nachdem das in den Proben enthaltene Selen mit Hilfe eines oxidativen Druckaufschlusses in die Oxidationsstufe +4 überführt worden war.

Die Methode verläuft nach folgendem Schema:

1. In einem Druckaufschlußgefäß nach TÖLG [56] wird die selenhaltige Probe (Probenvolumen max.1 ml) mit einer ausreichenden Menge Perhydrol (H_2O_2 34%) und konzentrierter Salpetersäure(spez.Gew. 1.41) in einer flach verlaufenden Temperaturanstiegskurve auf 15o°C erhitzt. Nach 3 h werden die Gefäße langsam abgekühlt.
2. Die aufgeschlossene Probe wird durch Auswaschen mit insgesamt 5 ml o.1 N HCl in Reagenzgläser überführt.
3. Zur Entfernung nicht umgesetzter Salpetersäure und bei stark chloridhaltigen Proben evtl. entstandenem Chlor wird die Probe zweimal mit insgesamt 4 ml Cyclohexan extrahiert.

4. Die so gereinigte Probe wird mit 1 ml einer o.1 %-igen Lösung von 2,3-Diaminonaphthalin in o.1N HCl, die zuvor zweimal mit je einem halben Volumen Cyclohexan von Verunreinigungen befreit wurde, versetzt und im Dunkeln 2o min bei 5o°C inkubiert.
5. Nach dem Abkühlen werden die Proben mit 1 ml Cyclohexan geschüttelt. (Extraktionsdauer: 2.5min)
6. Man verwirft die wäßrige Phase und extrahiert die Cyclohexanphase noch zweimal mit je 2.5 ml o.1 N HCl.
7. Die Fluoreszenz der so gewaschenen Cyclohexanphase bei 48o nm für eine Anregungswellenlänge von 365 nm wird bestimmt.

Die Eichung der Methode erfolgt durch den Einsatz einer Standardselenitlösung nach den Vorschriften des National Bureau of Standards, U.S.A.,[57], die der gleichen Aufschlußprozedur unterzogen wird wie die Proben.

3.2.4. Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten

Die Präparation von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten erfolgte in mehreren Fällen nach folgender Methode:

1. Beschaffung und Auswahl von Rinderblut mit hoher Glutathionperoxidaseaktivität
   Rinderblut wird durch Zusatz von tri-Natriumcitrat ungerinnbar gemacht und auf seine Glutathionperoxidaseaktivität getestet. Nur Blut mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 5o mU/mg Hämoglobin wird weiterverarbeitet.
2. Herstellung eines salzfreien Hämolysats
   Mittels eines Separators werden die Erythrozyten vom Plasma getrennt. Die entstandene Erythrozytensuspension wird zweimal mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 1.2% Natriumchlorid und o.4% tri-Natriumcitrat aufgeschlämmt und mittels des Separators gewaschen.

Die gewaschenen Erythrozyten werden durch Zusatz von 1 Volumen destilliertem Wasser hämolysiert, und die Erythrozytenmembranen durch Zentrifugation entfernt. Die Entsalzung erfolgt nach Zusatz von 0.01 Volumen einer 10%-igen Lösung von Triton X-100 in Wasser durch kontinuierliche Dialyse gegen Leitungswasser mittels Hohlfaserdialysatoren (wirksame Oberfläche $2.5 m^2$).

3. Adsorption an DEAE-Sephadex A-50
   Das entsalzte Hämolysat wird nach Zusatz von 0.1 Volumen eines Puffers aus 50 mM TRAP [pH 7-7.5], 100 mM NaCl, 1% Mercaptoäthanol und 1% Triton X-100 mit DEAE-Sephadex A-50 verrührt, welches zuvor mit einem Puffer aus 5 mM TRAP [pH 7-7.5], 10 mM NaCl, 0.1% Mercaptoäthanol und 0.1% Triton X-100 äquilibriert worden war. Der beladene Ionenaustauscher wird in einer Säule mit ebengenanntem Puffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem Puffer aus 5 mM TRAP [pH 7-7.5], 100 mM NaCl, 1% Mercaptoäthanol und 0.1% Triton X-100. Diese Ionenaustauschchromatographie kann nach Entsalzung und Konzentration des Eluats in kleinerem Maßstab wiederholt werden.
4. Adsorption an XAD - 8 [58]
   Das Eluat des Anionenaustauschers wird mittels einer Hohlfaserpatrone (BDF 50 1006) auf ein Fünftel des ursprünglichen Volumens konzentriert und in der unter 3.2.4.2. beschriebenen Weise dialysiert. Die durch Zusatz von 0.1 Volumen 190 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5.8 eingestellte Lösung wird an den makroretikulären Adsorber XAD-8 adsorbiert.
   Nach Waschen mit 19 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5.8 erfolgt die Elution von Glutathionperoxidase mit 1 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 (unter Zusatz von 1% Mercaptoäthanol).
5. Gelchromatographie auf Sephadex G-150 fine
   Das Eluat wird wie unter 3.2.4.4. beschrieben eingeengt und mit einem Puffer aus 5 mM TRAP [pH 7-7.5], 20 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 und 1% Mercaptoäthanol

auf Sephadex G-150 fine chromatographiert.

6. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit
   Das Eluat wird direkt auf eine Säule mit Hydroxylapatit aufgetragen und mit dem letztgenannten Puffer gewaschen.
   Glutathionperoxidase wird mit einem 80 mM Kaliumphosphatpuffer (unter Zusatz von 1% Mercaptoäthanol) pH 7.2 fraktioniert eluiert.
7. Überführung des gereinigten Enzyms in eine Lagerform
   Die enzymatisch aktiven Fraktionen werden durch Einrühren von trockenem Sephadex G-25 coarse konzentriert und durch Chromatographie auf Sephadex G-25 fine entsalzt. Die erhaltene Lösung wird bis zu einer Konzentration von 1% mit Laktose [58] versetzt und gefriergetrocknet.

Säulendimensionen und Ansatzmengen richten sich nach der zu verarbeitenden Blutmenge und müssen für jede Präparation gesondert berechnet werden.

3.2.5. Behandlung von Glutathionperoxidase mit starken reduzierenden Agenzien

3.2.5.1. Behandlung mit Natriumdithionit

200 µg (2.38 nmol) reine Glutathionperoxidase (spez. Akt. 500 U/mg) wurden in 200 µl 50mM MOPS-Puffer pH 7.2 gelöst. Davon wurden insgesamt 50 µl für Tests entnommen, die verbleibenden 150 µl wurden mit 50 µl 100 mM Natriumdithionitlösung versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Sephadex G-25 fine (Säulendimensionen: d=9 mm; l= 30 cm) chromatographiert.

3.2.5.2. Behandlung mit Natrium- bzw. Kaliumtetraboranat

100 µg (1.19 nmol) reine Glutathionperoxidase (s.a. 3.2.5.1.) wurden in 100 µl 500 mM MOPS-Puffer pH 7.5 gelöst und nach Aktivitätsbestimmung mit 10 - 10 000 fachem Überschuß an Natrium- bzw. Kaliumtetraboranat versetzt. Die Inkubationsansätze wurden bezüglich der enzymatischen Aktivität untersucht.

Zusätzlich wurde ein UV-Absorptionsspektrum des Inkubationsansatzes gegen einen Blindansatz ohne Enzymzugabe aufgenommen.

3.2.6. Behandlung von Glutathionperoxidase mit denaturierenden Agenzien in Gegenwart starker Reduktionsmittel

3.2.6.1. Behandlung mit Natriumdodecylsulfat in Anwesenheit von Dithiothreitol

400 µg (4.76 nmol) reine Glutathionperoxidase (s.a. 3.2.5.1.) wurden in 500 µl dest. Wasser gelöst. Davon wurden insgesamt 30 µl Proben entnommen, der Rest nach 30 -minütiger Inkubation mit 10 mg Dithiothreitol bei 37°C mit 50 ul einer 10%-igen Lösung von Natriumdodecylsulfat in Wasser 2 min auf 100°C erhitzt.
400 µl des Inkubationsansatzes wurden auf Sephadex G-25 fine wie unter 3.2.5.1. beschrieben mit 50 mM MOPS -Puffer pH 7.4 chromatographiert.
In den erhaltenen Fraktionen wurden enzymatische Aktivität, Proteinkonzentration und Selengehalt bestimmt.

3.2.6.2. Behandlung mit Harnstoff in Gegenwart von Glutathion

100 µg (1.19 nmol) reiner Glutathionperoxidase (s.a. 3.2.5.1. wurden in 1 ml 5mM MOPS-Puffer pH 7.0 gelöst und nach Versetzen mit 100 µl einer kurz zuvor neutralisierten Lösung von Glutathion (c=3.07 mg/ml) in Wasser 30 min bei 37°C inkubiert.
In den Inkubationsansatz wurden 360 mg umkristallisierter Harnstoff in 200 ul 50 mM MOPS-Puffer pH 7.0 gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zweigeteilt:

1. eine Hälfte wurde in einer Dialysezelle gegen 250 ml 5 mM MOPS-Puffer pH 7.0 dialysiert
2. eine Hälfte wurde auf Sephadex G-25 fine (Fertigsäule PD2 Pharmacia) entsalzt.

In den entsalzten Proben wurde die enzymatische Aktivität bestimmt.

3.2.6.3. Behandlung mit Harnstoff in Gegenwart von Kaliumtetraboranat

Analog zu 3.2.6.3. wurde ein Experiment durchgeführt, bei welchem statt Glutathion Kaliumtetraboranat als Reduktionsmittel verwendet wurde. Der pH-Wert der Puffer wurde hier auf 7.4 erhöht, da Kaliumtetraboranat bei pH 7.o schnell zerstört wird.

3.2.7. Behandlung mit Perameisensäure und Totalhydrolysen

3.2.7.1. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit Perameisensäure

Im Normalfall wurde 1 mg (11.9 nmol) reines Enzym in 5oo µl dest. Wasser gelöst, zur Lagerung zugesetztes Glutathion durch Chromatographie auf Sephadex G-25 fine (s.a. 3.2.5.1.) entfernt,und der Ansatz mit 5 mg Laktose lyophilisiert.
Der gefriergetrockneten Probe wurde bei einer Temperatur von 0°C o.5 ml Perameisensäurereagenz zugesetzt und der Ansatz 3 Stunden lang im Eisbad belassen. Die Herstellung des Perameisensäurereagenzes erfolgte nach HIRS [59] durch einstündige Reaktion von 1 Volumen Perhydrol und 1 Volumen 88%-iger Ameisensäure bei 0°C. Das überschüssige Reagenz wurde mit einer Drehschieberpumpe über eine mit festem Kaliumhydroxid beschickte Kühlfalle abgezogen. Die trockene Probe wurde in o.5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

3.2.7.2. Modifizierung von Referenzsubstanzen mit Perameisensäure

Je 1 mg der Substanzen Selenocystin, Cystin, Selenomethionin und Laktose wurden in der unter 3.2.7.1. beschriebenen Weise behandelt.

3.2.7.3. Saure Totalhydrolyse von Proben aus 3.2.7.1. und 3.2.7.2.

Die lyophilisierten Proben wurden im Bombenrohr mit o.5 ml 6 N HCl versetzt, unter Stickstoff abgeschmolzen und 24-48h bei 11o°C hydrolysiert.

Die abgekühlten Hydrolysate wurden im Vakuum in Anwesenheit von Kaliumhydroxid zur Trockne eingedengt.

5.2.7.4. Enzymatische Totalhydrolyse von Proben aus 5.2.7.1. und 5.2.7.2.

Die lyophilisierten Proben wurden in 500 µl 0.1 M TRIS-Puffer pH 7.6 aufgenommen, mit 500 µl einer Lösung von Pronase (Lösung mit spez. Akt.: 4000 PU/g) im gleichen Puffer versetzt und 48 h bei 37°C inkubiert. Über eine Mehlfaserfiltrationszelle (Ausschlußgrenze MW 10 000) wurde das Enzym entfernt.

Das Ultrafiltrat wurde mit 1 mg Aminopeptidase M (spez. Aktivität: 7000 U/mg Substanz), 1 mg Prolidase (spez. Aktivität: 270.7 U/mg) und 100 µl 0.1 M Mangan-II-chloridlösung versetzt und 48 h bei 37°C inkubiert.

Die proteolytischen Enzyme wurden wie oben erwähnt

5.2.7.5. Automatische Aminosäureanalyse der Hydrolysate

Die Proben wurden bis zu einem Volumen von 1 ml mit Hilfe eines LKB4400A-Aminosäureanalysators auf einem Beckman-Ionenaustauscherharz MSC chromatographiert. Die Laufdaten des Gerätes waren:

Flußgeschwindigkeit des Puffers : 68 ml/h
Flußgeschwindigkeit des Ninhydrins: 34 ml/h
Säulendimensionen : d= 9mm : l= 64cm : Füllhöhe: 58cm
Temperatur : 57/37°C
Verwendetes Puffersystem: 0 - 120 min 0.2 N Na-citrat pH 5.28
120 - 220 min 0.2 N Na-citrat pH 4.25
220 - 400 min 0.2 N Na-citrat pH 6.40

Zunächst wurde in einem analytischen Lauf die Position und Menge der Aminosäuren aufgrund ihrer Reaktion mit Ninhydrin gestimmt. In einem zweiten präparativen Lauf ohne Ninhydrinzumischung wurde das Eluat fraktioniert aufgefangen und Selengehalt und Aminosäuregehalt der Fraktion bestimmt.

3.2.8. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit alkylierenden Substanzen

3.2.8.0. Vorbemerkung

Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden unter Inertgas (Stickstoff 99.9%) durchgeführt. Zur Reinigung von letzten Spuren Sauerstoff wurde der verwendete handelsübliche Stickstoff [illegible] zusätzlich durch alkalische Pyrogallollösung geleitet.

3.2.8.1. Bindung von radioaktiv markierten Halogenessigsäurederivaten an Glutathionperoxidase

Folgende Halogenessigsäurederivate sollten mit reduzierter Glutathionperoxidase umgesetzt werden:

1. 1-^{14}C -Chlorazetat im 10000 fachen Überschuß
2. 2-^{14}C -Jodazetat im 1000 fachen Überschuß
3. 1-^{14}C -Jodazetamid im 100% fachen Überschuß

Die Überschüsse sind bezogen auf das Molekulargewicht des nativen tetrameren Enzyms.
Die Modifizierung sollte sowohl an nativer wie auch an zuvor mit Harnstoff denaturierter Glutathionperoxidase vorgenommen werden. Um die Bedingungen zu standardisieren wurde das in Tabelle 2 gezeigte Derivatisierungsprogramm durchgeführt.

Chlorazetat	Jodazetat	Jodazetamid
10 µl Enzymlösung (0,119 nmol) c=1mg/ml + 50µl 0,1M MOPS-Puffer pH 7,3 [+ 50µl 12M Harnstoff] *)		
Vorinkubation 2min 37°C + 50µl Cocktail bestehend aus:		
50µl Chlorazetat 'kalt' c=1,32 mg/ml 10µl 1-14C-Chlorazetat [25µCi] spez Akt. 49mCi/mmol	50µl Jodazetat 'kalt' c=0,311 mg/ml 2µl 2-14C-Jodazetat [2,5µCi] spez. Akt :57mCi/mmol	50µl Jodazetamid 'kalt' c=0,312 mg/ml 2µl 1-14C-Jodazetamid [2,5µCi] spez Akt 57 mCi/mmol
Inkubation 6h 37°C		
Gelchromatographie auf Sephadex G25 fine [Säule K9/30] Startpuffer: 0,1M MOPS-Puffer pH7,3		

*) Option siehe Text

Tabelle 2: Programm zur Modifizierung von Glutathionperoxidase mit radioaktiv markierten Halogenessigsäurederivaten

Die Auswertung der Experimente erfolgte nach Messung der proteingebundenen und der nicht proteingebundenen Radioaktivität im ß-Flüssigszintillationszähler. Als Szintillator wurde hier wie auch in allen anderen Fällen BRAY-Solution verwendet.

3.2.8.2. Wirkung von Cyanid auf die Stöchiometrie der Alkylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat

Analog zu den in 3.2.8.1. beschriebenen Experimenten wurde Glutathionperoxidase, die zunächst durch Zusatz von 2 mM tert. Butylhydroperoxid oxidiert und dann mit einer Lösung von 1oo mM Kaliumcyanid in o.1 M MOPS-Puffer pH 9.o ca. 3 h inkubiert worden war, mit Chlorazetat umgesetzt.

3.2.8.3. Hemmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase durch Chlorazetat

1oo µg (1.19 nmol) Glutathionperoxidase wurden in 5oo µl o.1 M TES-Puffer pH 7.2 gelöst und mit dem gleichen Puffer durch Chromatographie auf Sephadex G-25 fine (PD2--Fertigsäule -Pharmacia) von zur Stabilisierung beigegegebenem Glutathion gereinigt. Das proteinhaltige Eluat wurde mit 2 mg Kaliumtetraboranat behandelt und je 1o µl mit 11o µl Chlorazetatlösungen steigender Konzentrationen versetzt. Nach 1o,2o,4o,4o und 12o min wurden Proben entnommen und die enzymatische Aktivität bestimmt.

3.2.8.4. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat nach vorheriger Jodazetamidbehandlung

1oo µg (11.9 nmol) Glutathionperoxidase wurden in 5oo µl o.1 M MOPS-Puffer pH 7.3 gelöst, wie bereits unter 3.2.8.3. beschrieben von Glutathion befreit, mit 5o µl einer 23 mM Lösung von Jodazetamid in Wasser (1ooo facher Überschuß) versetzt und 3o min bei 37°C inkubiert.
Das überschüssige Reagenz wurde durch Behandlung mit 5o µl einer 47.6 mM Glutathionlösung (2 facher Überschuß), die kurz zuvor vorneutralisiert worden war, entfernt. (3o min, 37°C)

Anschließend wurden 1oo µl einer 2oo mM Chlorazetatlösung zugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert.
Das Protein wurde dann durch Chromatographie auf Sephadex G-25 fine (Fertigsäule PD 2, Pharmacia) von niedermolekularen Reagenzien abgetrennt. In den proteinhaltigen Fraktionen wurde die enzymatische Aktivität, die Proteinkonzentration und der Selengehalt bestimmt.
Von dem carboxymethylierten Enzym wurde ein UV-Absorptionsspektrum wie auch ein Röntgenphotoelektronenspektrum aufgenommen.

3.2.8.5. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase nach vorheriger Reduktion mit Kaliumtetraboranat

1o mg (119 nmol) Glutathionperoxidase wurden in 5oo µl o.1 M MOPS-Puffer pH 7.2 gelöst und mit insgesamt 5 mg festem Kaliumtetraboranat in kleinen Portionen versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 25°C wurden 1ooo µl radioaktiv markiertes Chlorazetat (1ooo µl unmarkiertes Chlorazetat (c=1.19 mmol/ml)+ 5o µCi 1-^{14}C-Chlorazetat (spez.Aktivität: 49.2 mCi/mmol)) zugegeben und 3 h bei 37°C belassen.
Das überschüssige Reagenz wurde durch Chromatographie auf Sephadex G-25 fine (K9/3o Pharmacia) abgetrennt und fraktioniert aufgefangen. In den Fraktionen wurde Selengehalt, Radioaktivität und Proteinkonzentration bestimmt.

3.2.8.6. Saure Hydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

1ooo µl des Eluats wurden in einem Druckaufschlußgefäß nach TÖLG [56] mit 1ooo µl konz. Salzsäure versetzt und 15 h bei 11o°C hydrolysiert. Die abgekühlten Hydrolysate wurden in Anwesenheit von festem Kaliumhydroxid im Vakuum zur Trockne eingeengt.

3.2.8.7. Enzymatische Hydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

16oo µl des Eluats wurden mit 5 mg Pronase versetzt, 48h bei 37°C inkubiert und anschließend die Pronase durch

Ultrafiltration wie unter 3.2.7.5. beschrieben entfernt. Nach Zusatz von 1oo µl Prolidase (Vol.akt.: 21o7 U/ml), 1oo µl o.2 M Mangan-II-chloridlösung, 1 µl Mercaptoäthanol und 1 mg Aminopeptidase M (spez. Akt.: 5ooo U/mg Substanz) wurde weitere 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend die peptidolytischen Enzyme durch Ultrafiltration entfernt.

3.2.8.8. Automatische Aminosäureanalyse von Hydrolysaten carboxymethylierter Glutathionperoxidase

Die Hydrolysate wurden mit einem Beckman UNICHROM-Aminosäureanalysator auf einem Ionenaustauscherharz vom Typ BECKMAN M82^{+} unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Flußgeschwindigkeit des Puffers : 68 ml/h
Flußgeschwindigkeit des Ninhydrins: 34 ml/h
Säulendimensionen: d= 8mm; l= 69 cm ; Füllhöhe: 54 cm
Temperatur: 55°C
Verwendetes Puffersystem: o - 12o min o.2 N Na-citrat pH 3.25
12o - 22o min o.2 N Na-citrat pH 4.25
22o - 4oo min o.2 N Na-citrat pH 6.1o

Für die Arbeit mit Selenverbindungen der Oxidationsstufen -1 und -2 mußte die Anordnung dahingehend modifiziert werden, daß sowohl der Probengeber wie auch der Fraktionssammler für die Elution und auch alle Puffer unter Inertatmosphäre gehalten wurden.
Wie bereits unter 3.2.7.5. beschrieben wurden analytische und präparative Läufe durchgeführt. In den erhaltenen Fraktionen wurden Selengehalt, Radioaktivität und Aminosäuren quantitativ bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte hier unter gleichzeitiger Charakterisierung mit Hilfe des von SILBERNAGL entwickelten Aminosäureanalysators aufgrund der Reaktion mit o-Phthaldialdehyd.

3.2.9. Darstellung von carboxymethylierten Aminosäuren

3.2.9.1. Reindarstellung von Se-Carboxymethylselenocystein nach [61]

1oo mg Selenocystin wurden unter Inertatmosphäre in 1.5 ml Wasser suspendiert und portionsweise mit 4o mg Kaliumtetraboranat versetzt. Nachdem alles Selenocystin gelöst war, wurde das Reduktionsmittel durch Zugabe von 2 N HCl zerstört und 6o mg Chloressigsäure zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2 N Kalilauge auf 7.5 eingestellt.
Nach einer Reaktionszeit von 1o min wurde der pH-Wert auf 5 eingestellt und nach Stehen über Nacht ein feiner Niederschlag abfiltriert.
Das Filtrat wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und der Niederschlag abzentrifugiert. Nach Waschen mit zweimal o.5 ml Wasser und absolutem Alkohol wurde mit Diäthyläther getrocknet. Das entstehende Pulver war weiß und nahm später eine gelbe bis schließlich braune Farbe an.

3.2.9.2. Darstellung von carboxymethylierten Aminosäuren unter den in 3.2.8.5. beschriebenen Bedingungen

Von den folgenden Aminosäuren wurden Derivate nach der im folgenden gegebenen Vorschrift dargestellt:
Cystin, Selenocystin, Methionin, Selenocystamin, Glycin und Histidin
5oo nmol der Aminosäure wurden in o.5 ml o.1 M Ammoniumhydrogenkarbonatlösung pH 7.5-7.9 mit 5 mg Kaliumtetraboranat versetzt und mit einem 1ooo fachen Überschuß an Chlorazetat (Chloressigsäure mit Ammoniak neutralisiert) 6 h bei 37°C inkubiert.
Von den Substanzen wurden die Retentionszeiten in der automatischen Aminosäureanalyse bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Die quantitative Bestimmung von Selen in organischem Material

Die von WATKINSON [55] beschriebene fluorometrische Methode, bei welcher Selen der Oxidationsstufe +4 mit 2,3-Diaminonaphthalin zu einem in Cyclohexan extrahierbaren Komplex reagiert, wurde so modifiziert, daß sie:

1. die Bestimmung von Selen mit einer Erfassungsgrenze von besser als 1o ng (1oo pmol) in einem Bereich bis zu 15o nmol erlaubt.
2. weitestgehend von Störeinflüssen unabhängig ist.

Dieses wurde wie bereits unter 3.2.3. ausgeführt erreicht durch

1. die Einführung eines Druckaufschlusses der Proben mit konzentriertem Wasserstoffperoxid und konzentrierter Salpetersäure,
2. die Einhaltung einer wie in Abb.2 gezeigten Aufheizcharakteristik während des Aufschlusses,

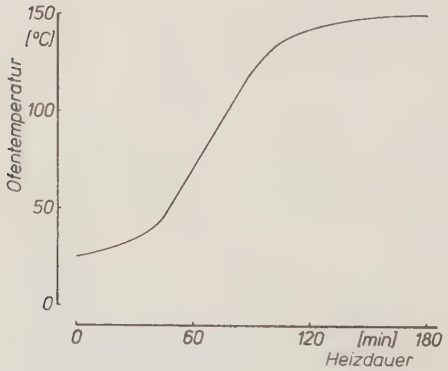


Abb.2: Aufheizcharakteristik des Ofens zum Aufschluß selenhaltiger Proben

3. die Extraktion mit Cyclohexan zur Entfernung störender Agenzien wie Chlor und Reduktionsprodukte von Salpetersäure, die geeignet sind, Diaminonaphthalin unkontrolliert zu oxidieren.

Es erwies sich, daß die verwendete Methode geeignet ist, Selen in Leberproben und Futtermitteln mit einem Trockengewicht von nicht mehr als 25o mg zu bestimmen. Die Anwendbarkeit der Methode ist hier nach oben durch die Kapazität der Druckaufschlußgefäße limitiert.
Die in Abb.3 dargestellte Eichkurve ist linear über den dargestellten Bereich ($r^2 > o.995$), bei einer Selenmenge von 5 ng ist der Fehler ± 2o%, bei 2oo ng sinkt die Standardabweichung auf unter 1%. Die Linearität der Bestimmung wurde bis zu einer Selenmenge von <1o ug gezeigt.
Die Methode ist nicht einsetzbar für Proben, die insgesamt mehr als 2oo mg Chlorid/Probe enthalten. Ebenso können stark eisenhaltige Proben Störungen verursachen, deren Natur noch nicht geklärt werden konnte.

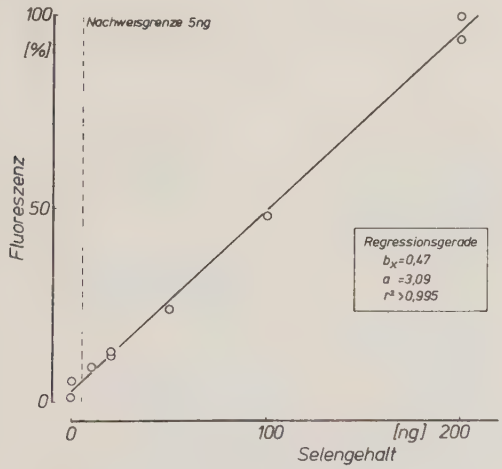


Abb.3:Eichkurve der Selenbestimmung
Proben: NBS-Standard c= 5oo ng/ml
Aufschlußmittel: 2oo µl Perhydrol; 2oo µl konz. Salpetersäure

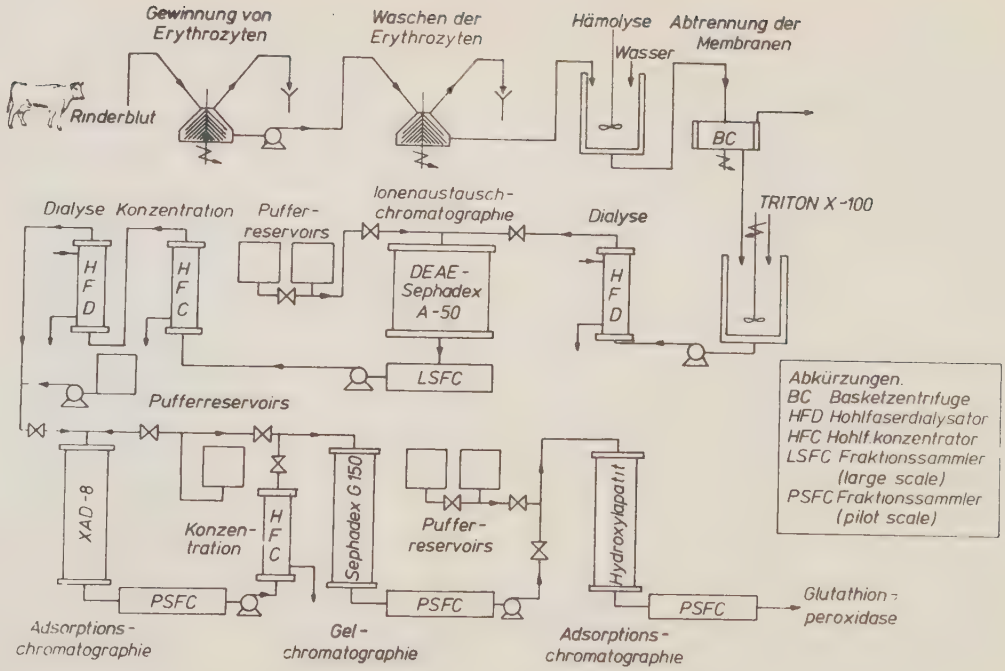


Abb.4: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten im halbtechnischen Maßstab

4.2. Isolation von Glutathionperoxidase im halbtechnischen Maßstab

4.2.1. Methodische Verbesserungen

Da auf den ersten Stufen der Isolierung von Glutathionperoxidase recht große Volumina zu bewältigen sind, wurden folgende, in Abb.4 dargestellte Techniken eingeführt:

1. Abtrennung und Waschen der Erythrozyten erfolgte mittels eines handelsüblichen Separators. Die Flußleistung des verwendeten Gerätes liegt bei 10 l/h. Die Verluste bei den Waschgängen konnten bis auf 15% minimiert werden, wenn der Erythrozytensuspension tri-Natriumcitrat zur Gerinnungshemmung zugesetzt wurde.
2. Dialyse und Konzentration wurden kontinuierlich mittels Hohlfaserdialysatoren und - konzentratoren in Anwesenheit des nichtionischen Detergenz Triton X-100 durchgeführt.
3. Als zusätzliches chromatographisches Verfahren wurde eine Adsorptionschromatographie an XAD-8, einem makroretikulären Adsorber eingeführt. Dieser Schritt wurde, wie Tab.3 zeigt, je nach Bedarf auf verschiedenen Stufen der Präparation eingesetzt.

XAD-8 Einsatz nach Stufe	Anreicherung	Ausbeute [%] [1]
Hämolysat (dialysiert)	100	100
DEAE-Sephadex A50-I [2]	10	100

[1] bezogen auf adsorbierte Aktivität
[2] Randfraktionen (spez. Akt.: 3U/mg)

Tabelle 3: Einsatz von XAD-8 zur Anreicherung von Glutathionperoxidase

Stufe	Volumen-aktivität [U/ml]	Protein-konzentration [mg/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamt-volumen [ml]	Gesamt-aktivität [U]	Ausbeute [%]	Anreicherung
Hämolysat (dialysiert)	8	200	0,04	100 000	800 000		
DEAE-Sephadex A50-I	29,6	1,4	21,6	25 000	739 000	93	540
DEAE-Sephadex A50-II	1050	22,4	46,5	220	231 000	29	1162
Sephadex G150	236	1,1	222	1000	236 000	29	5550
Hydroxylapatit	2474	4,5	547	44	108840	14	13662

Tabelle 4: Anreicherungstabelle einer Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten

4.2.2. Anreicherungstabelle einer Isolierung

Unter Berücksichtigung der gesammelten Erkenntnisse wurden mehrere Präparationen durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel für eine solche Isolierung zeigt Tabelle 4. Hier wurde die Adsorptionschromatographie an XAD-8 durch eine Rechromatographie an DEAE-Sephadex A-5o ersetzt, da die spezifische Aktivität des Ausgangsmaterials an dieser Stelle bereits so hoch war, daß auf den XAD-8 Schritt verzichtet werden konnte.

4.3. Wirkung starker reduzierender Agenzien auf Glutathionperoxidase

4.3.1. Wirkung von Natriumdithionit

Natriumdithionit ist in noch stärkerem Maße als Natriumsulfit geeignet, Disulfidgruppierungen in Proteinen zu spalten. Dieses ist bedingt durch das hohe negative Standardpotential der Reaktion

$$S_2O_4^{2-} \rightleftharpoons 2\,SO_2 + 2\,e^-$$

Aufgrund der großen Verwandtschaft zu Disulfidgruppen werden auch S-Se- und Se-Se-Bindungen reduziert.
Das durchgeführte Experiment sollte zeigen, ob Natriumdithionit einen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von Glutathionperoxidase hat.
Wie aus Abb. 5 hervorgeht wirkt das Reagenz leicht aktivierend auf Glutathionperoxidase. Die spezifische Aktivität des proteinhaltigen Eluats lag um ca. 25% höher als die eingesetzte spezifische Aktivität an Glutathionperoxidase.

4.3.2. Wirkung von Tetraboranaten

Natrium- und Kaliumtetraboranat enthalten als wirksame Komponente das Hydridion, welches aufgrund seines hohen negativen Standardpotentials (E_o= -1.24 V) und seiner geringen Größe als Reduktionsmittel für labile und schwer zugängliche Disulfidgruppierungen geeignet ist [62]. Ähnliches gilt wie schon unter 4.3.1. ausgeführt für S-Se- und Se-Se- Bindungen.

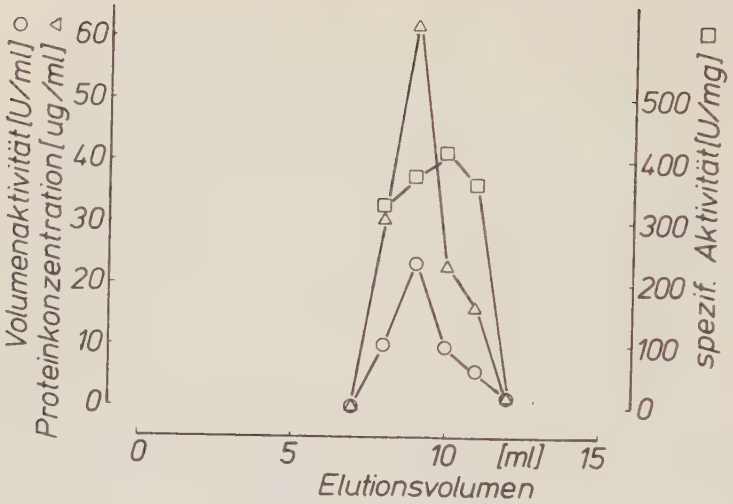


Abb. 5: Chromatographie von dithionitbehandelter Glutathionperoxidase auf Sephadex G-25 fine Volumen der Probe: 2oo µl

CHIU et al. [63] hatten berichtet, daß durch die Behandlung von Glutathionperoxidase mit Natriumtetraboranat die selenhaltige Komponente des Enzyms freigesetzt werde.

Sowohl Kalium- als auch Natriumtetraboranat zeigten in genügend gepufferten Lösungen weder eine aktivierende noch eine inhibierende Wirkung auf Glutathionperoxidase. Später aufgeführte Experimente (4.6.5.1.) zeigten, daß Selen auch nach Tetraboranatbehandlung im Proteinverband verbleibt.

Die Behandlung von Glutathionperoxidase mit Tetraboranaten hat jedoch starke Wirkungen auf die Form des UV-Absorptionsspektrum von Glutathionperoxidase. Wie Abb. 6 zeigt, verschwindet das beim nativen Enzym ausgeprägte Minimum der Absorption bei 254 nm.

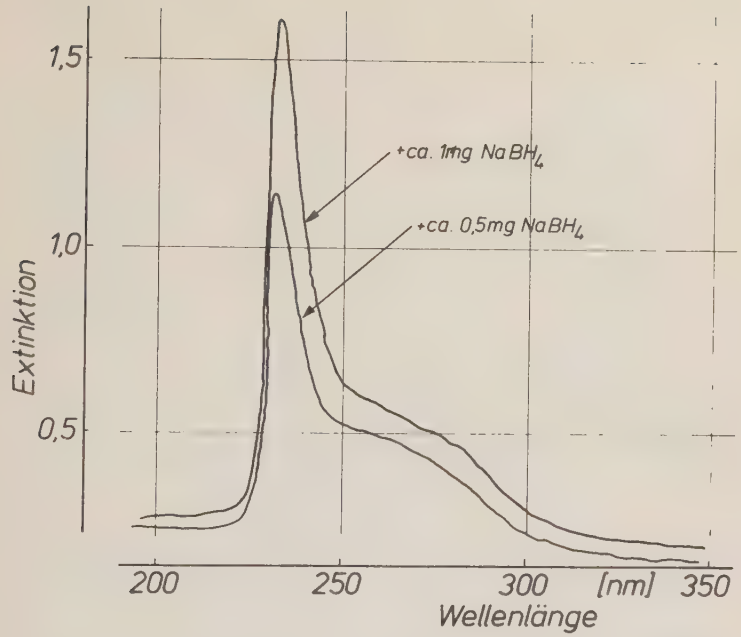


Abb.6: Absorptionsspektrum von Glutathionperoxidase nach Behandlung mit Natriumtetraboranat
Konzentration der Enzymlsg: c= o.1 mg/ml
Referenzlösung: o.5 M MOPS pH 7.5
Zugabe von Natriumtetraboranat in beide Küvetten

4.4. Wirkung von denaturierenden Agenzien auf Glutathionperoxidase unter reduzierenden Bedingungen

4.4.1. Dissoziation von Glutathionperoxidase in Untereinheiten durch Behandlung mit Natriumdodecylsulfat in Gegenwart von Dithiothreitol

Natriumdodecylsulfat ist aufgrund seiner Detergenzeigenschaften ein geeignetes Agenz zur Dissoziation eines Proteins in Untereinheiten und zur Auffaltung der Sekundärstruktur des nativen Proteins. Eine selenhaltige Komponente, die in Glutathionperoxidase über konformations-

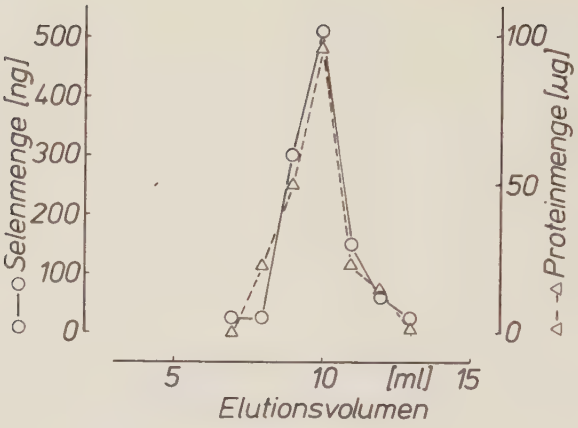


Abb.7: Chromatographie von Glutathionperoxidase nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat auf Sephadex G-25 fine
Volumen der Probe: 4oo µl

stabilisierte Wechselwirkungen gebunden ist, muß durch Störung der Konformation und Spaltung evtl. noch zusammenhaltender Disulfidgruppen freigesetzt werden können. Abb.7 zeigt, daß Selen und Protein einer mit Natriumdodecylsulfat vorbehandelten Glutathionperoxidase auf Sephadex G-25 im Ausschlußvolumen cochromatographiert. In den niedermolekularen Fraktionen wurde kein Selen gefunden. Die proteinhaltigen Fraktionen waren nicht mehr enzymatisch aktiv, die enzymatische Aktivität konnauch nicht durch bis zu 6o-minütige Inkubation mit Glutathion bei 37°C wiederhergestellt werden. In der Acrylamidelektrophorese zeigte sich nur eine Bande, die aufgrund ihrer Laufeigenschaften dem Monomer (MW=21ooo) zuzuordnen ist [18].

4.4.2. Behandlung von Glutathionperoxidase mit Harnstoff in Gegenwart von Glutathion bzw. Kaliumtetraboranat

Die Behandlung von Proteinen mit 6 M Harnstoff führt in den meisten Fällen zu einer Auffaltung der Sekundärstruktur. Diese Denaturierung ist für manche Proteine durch Entfernung des Reagenzes mittels z.B. Dialyse reversibel. Eine konformationsstabilisierte selenhaltige Komponente könnte also durch Harnstoff freigesetzt werden.
Behandelt man Glutathionperoxidase in Gegenwart von Glutathion mit 6 M Harnstoff, so kann die enzymatische Aktivität zu mehr als 8o% wiederhergestellt werden, wenn das Denaturierungsreagenz nach 6o-minütiger Inkubationsdauer durch Dialyse oder Gelchromatographie auf Sephadex G-25 fine entfernt wurde.
Eine vollständige Renaturierung des Enzyms wurde beobachtet, wenn statt Glutathion Kaliumtetraboranat als Reduktionsmittel eingesetzt wurde.

4.5. Totalhydrolysen von mit Perameisensäure oxidierter Glutathionperoxidase

Es wurde versucht, die selenhaltige Komponente von Glutathionperoxidase durch Oxidation mit Perameisensäure zu stabilisieren. Das so modifizierte Protein wurde sowohl einer sauren als auch einer enzymatischen Totalhydrolyse unterworfen.

4.5.1. Saure Hydrolyse mit 6 N Salzsäure

Während der oxidativen Behandlung und während der Hydrolyse wurde der Selengehalt der Proben bestimmt und in Tabelle 5 zusammengestellt.
Von dem Gesamtansatz wurden 5oo ul für den analytischen und 6oo ul für den präparativen Lauf des Aminosäureanalysators verwendet. Beide Chromatogramme wurden synchronisiert und in Abb.8 zusammengefaßt.
Die Rückrechnung auf die gesamte Probe ergibt folgendes Bild: In den Fraktionen mit signifikantem Selengehalt

Stufe	Ansatzvolumen [ul]	Selenmenge [ng]	Verlust [%]
natives Enzym	500	5140	
nach Perameisensäure behandlung	500	5070	1,3
nach saurer Hydrolyse	2200	880	83

Tabelle 5: Selenverluste während der Oxidation und der Totalhydrolyse mit 6 N Salzsäure von Glutathionperoxidase (Methode s.a. 3.2.7.1. und 3.2.7.3.)

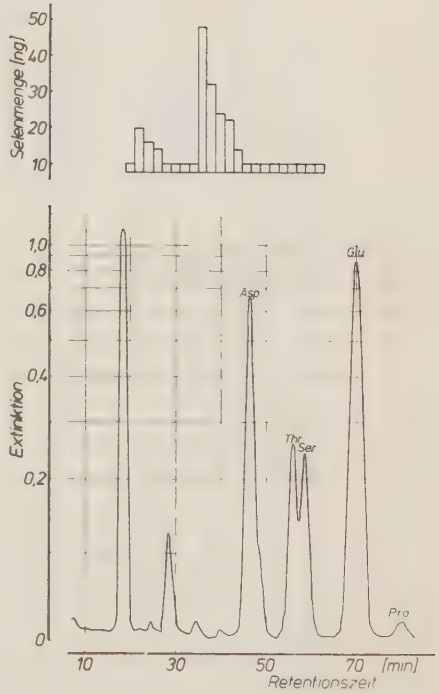


Abb.8 : Aminosäureanalyse des sauren Totalhydrolysats von oxidierter Glutathionperoxidase
oberer Teil: Verteilung der selenhaltigen Fraktionen (2 min) in Abhängigkeit von der Retentionszeit
unterer Teil: Verteilung der ninhydrinpositiven Produkte

sind insgesamt 528 ng enthalten, das entspricht einem Verlust von 4o% während der Aminosäureanalyse und 9o% während der gesamten Prozedur.
Betrachtet man die Verteilung der Aminosäuren quantitativ, so ergibt sich das in Tabelle 6 zusammengefaßte Ergebnis, welches im Großen und Ganzen mit den von GÜNZLER [39] angegebenen Werten übereinstimmt.

Aminosäure	Zahl der Reste proMol Enzym
Cysteinsäure	8
Asparaginsäure	62
Threonin	29
Serin	28
Glutaminsäure	65
Glycin	56
Alanin	41
Valin	37
Methionin	-
Isoleucin	18
Leucin	62
Tyrosin	-
Phenylalanin	29
Histidin	-
Lysin	19
Arginin	34

Tabelle 6: Quantitative Aminosäureanalyse des sauren Totalhydrolysats von oxidierter Glutathionperoxidase

Stufe	Ansatzvolumen [ul]	Selenmenge [ng]	Verlust [%]
natives Enzym	800	4520	
nach Perameisensäure behandlung	500	4125	<10
nach enzymatischer Hydrolyse	800	4640	-
nach Ultrafiltration	2100	4400	<10

Tabelle 7: Selenverluste während der Oxidation und der enzymatischen Hydrolyse von Glutathionperoxidase (Methode s.a. 3.2.7.4.)

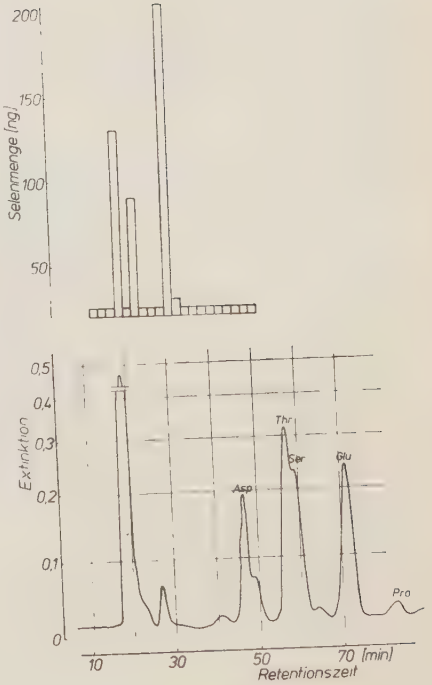


Abb.9: Aminosäureanalyse des enzymatischen Hydrolysats von oxidierter Glutathionperoxidase
oberer Teil: Verteilung der selenhaltigen Fraktionen (2min)in Abhängigkeit von der Retentionszeit
unterer Teil: Verteilung der ninhydrinpositiven Produkte

4.5.2. Enzymatische Hydrolyse mit einer Kombination proteolytischer und peptidolytischer Enzyme

Nach verschiedenen Vorversuchen zur enzymatischen Hydrolyse erwies sich folgende Reihenfolge als sinnvoll:

1. Pronase
2. Aminopeptidase M
3. Prolidase (mit Mangan-II-chlorid und Mercaptoäthanol als Aktivatoren)

Die Pronase mußte vor der Zugabe der Peptidasen entfernt werden, da ansonsten eine Verdauung der peptidolytischen Enzyme erfolgte. Hierzu erwies sich die Methode der Ultrafiltration trotz der auftretenden Verluste als geeignetes Verfahren.
Wie schon unter 4.5.1. beschrieben, wurde die Selenmenge während der gesamten Hydrolyseprozedur verfolgt und in Tabelle 7 zusammengefaßt.
5oo µl des Hydrolysats wurden für einen analytischen Lauf des Aminosäureanalysators verwendet. Die Aminosäuren konnten aufgrund der Selbstverdauung der proteolytischen Enzyme nicht quantitativ verfolgt werden. Demzufolge muß der untere Teil von Abb.9 nur qualitativen Charakter haben.
Das im oberen Teil dargestellte Ergebnis des präparativen Laufes mit 8oo µl Probenvolumen zeigt einen stark erhöhten Selengehalt bei einer Retentionszeit von 32 min (Asp. 48 min). Bezogen auf den Gesamtansatz wurden 1441 ng entsprechend 3o% der Ausgangsmenge an Selen wiedergefunden. Weitere 7% waren über viele Fraktionen verstreut.

4.5.3. Modifizierung von Aminosäuren mit Perameisensäure

Die Retentionszeiten der ninhydrinpositiven Produkte der Perameisensäureoxidation von Schwefel- und Selenoaminosäuren sind in Tabelle 8 zusammengestellt.
Es ist anzumerken, daß das durch die Oxidation von Selenocystin entstehende Produkt in Lösung nicht stabil ist und nach ein-tägigem Stehen bei Raumtemperatur

Ninhydrinpositive Oxidationsprodukte von	Retentionszeit [min] [1]
Selenocystin	20,35,46 [2]
Selenomethionin	20,26
Cystin	20
Methionin	24

[1] Retentionszeit fur Asp 48min
[2] Nicht bestandig bei saurer Hydrolyse

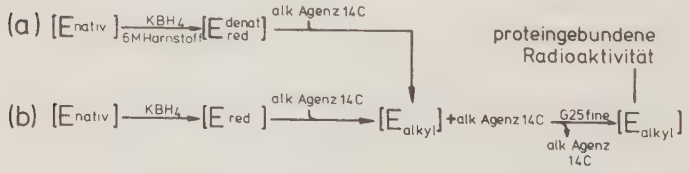
Tabelle 8: Retentionszeiten der ninhydrinpositiven Oxidationsprodukte von Schwefel- und Selenoaminosäuren im Aminosäureanalysator

im Licht rotes Selen ausfällt.

4.6. Modifizierung von Glutathionperoxidase mit alkylierenden Agenzien

4.6.1. Stöchiometrie der Bindung von ^{14}C-markierten Halogenessigsäurederivaten

Es wurde die Stöchiometrie der Bindung von Chlorazetat, Jodazetat und Jodazetamid an reduzierte und an zusätzlich mit Harnstoff vorbehandelte Glutathionperoxidase bestimmt. Der Verlauf der Experimente kann wie folgt zusammengefaßt werden:



Für die einzelnen Reagenzien wurden folgende Ergebnisse erhalten und in Tabelle 9 zusammengestellt.

Reagenz	Vorbehandlung	$\frac{[Mol]Reagenz}{[Mol]Enzym^{1}}$	$\frac{[Mol]Selen}{[Mol]Enzym^{1}}$
Chlorazetat (10000fach)	—	2,2	4
	6M Harnstoff	2,2	4
Jodazetat (1000 fach)	—	2,1	3,5
	6M Harnstoff	2,1	3,5
Jodazetamid (1000 fach)	—	<0,1	4
	6M Harnstoff	4	4

[1] Tetramer MW=84000

Tabelle 9: Stöchiometrie der Bindung von ^{14}C-markierten Halogenessigsäurederivaten an native und harnstoffvorbehandelte, reduzierte Glutathionperoxidase
Dieses Ergebnis wurde in [64] bereits veröffentlicht.

4.6.2. Wirkung einer Cyanidvorbehandlung auf die Stöchiometrie der Bindung von 1-^{14}C-markiertem Chlorazetat an reduzierte Glutathionperoxidase

PROHASKA et al. [65] haben gezeigt, daß die Cyanidbehandlung von zuvor mit Cumolhydroperoxid oxidierter Glutathionperoxidase zur Elimination des größten Teil des Selens (93%) aus dem Proteinverband führt.
Demzufolge wurde in dieser Weise vorbehandelte Glutathionperoxidase nach dem in 4.6.1. gegebenen Schema mit 1-^{14}C- markiertem Chlorazetat umgesetzt und die Stöchiometrie der Bindung bestimmt.
Nach dreistündiger Vorbehandlung wurde keine Chlorazetatbindung an das Enzym festgestellt, eine Überprüfung des Selengehaltes des vorbehandelten Enzyms ergab, daß mehr als 95% des ursprünglich vorhandenen Selens aus dem Proteinverband eliminiert worden war.

4.6.3. Hemmung der enzymatischen Aktivität von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat

Analog zu der bereits von GÜNZLER [39] und LADENSTEIN [66] beschriebenen Inhibition von Glutathionperoxidase durch Jodazetat wurde die Hemmwirkung von Chlorazetat auf zuvor mit Jodazetamid vorbehandeltes Enzym untersucht. Den zeitlichen Verlauf der Inhibition für verschiedene Chlorazetatkonzentrationen zeigt in halblogarithmischer Darstellung Abb.1o.

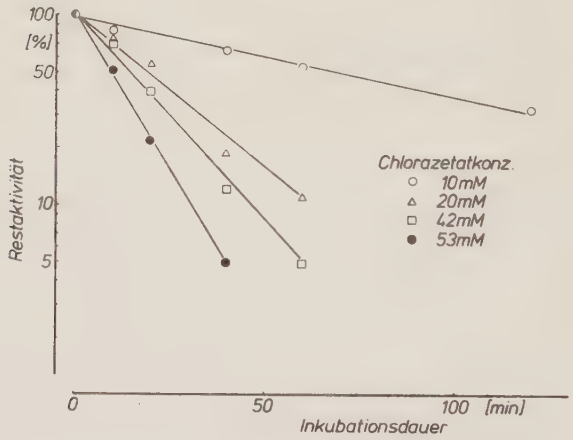


Abb.1o: Zeitlicher Verlauf der Inhibition von Jodazetamid-vorbehandelter, reduzierter Glutathionperoxidase durch verschiedene Konzentrationen von Chlorazetat (Methode s.a.3.2.8.4.)
Enzymkonzentration:o.2 mg/ml (5ooU/mg)
Zusatz von Jodazetamid im 1oo fachen Überschuß, Abfangen des überschüssigen Jodazetamid mit zweifachem Überschuß an Glutathion

In weiteren Experimenten wurde aufgrund des in 4.6.2. erhobenen Befundes, daß Jodazetamid an das reduzierte und native Enzym nicht gebunden wird, mit Tetraboranaten reduzierte Glutathionperoxidase direkt mit Chlorazetat umgesetzt. Der zeitliche Verlauf der Hemmwirkung ist für verschiedene Chlorazetatkonzentrationen in Abb.11 halblogarithmisch dargestellt. Es zeigt sich, daß eine vollständige Hemmung der enzymatischen Aktivität bereits mit einer effektiven Chlorazetatkonzentration von 20 mM nach 120 min erzielt wird.

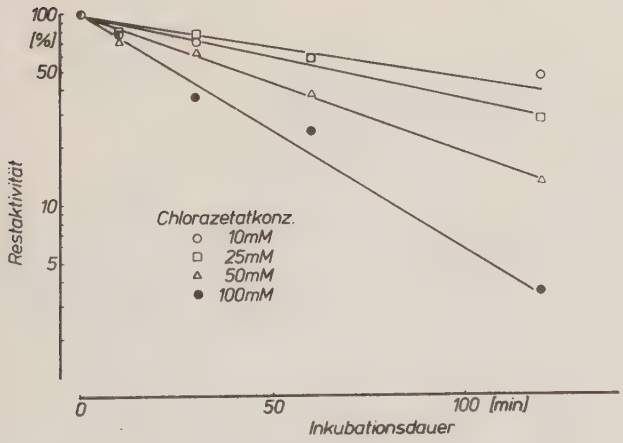
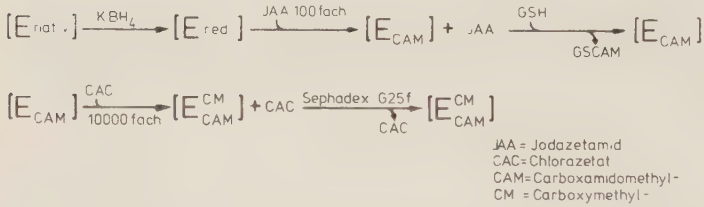


Abb.11: Zeitlicher Verlauf der Inhibition von reduzierter Glutathionperoxidase durch Chlorazetat in verschiedenen Konzentrationen
(Methode s.a. 3.2.6.2.)
Enzymkonzentration: 0.2 mg/ml (500 U/mg)

4.6.4. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat nach Jodazetamidvorbehandlung

Dem Experiment lag folgender Verlauf zugrunde:



Während des gesamten Experimentes wurden die enzymatische Aktivität, der Proteingehalt und der Selengehalt kontrolliert. Das Ergebnis ist in Tabelle 1o zusammengestellt.

Stufe	Gesamtaktivität [U]	Proteingehalt [µg]	Selengehalt [ng]	[Mol]Selen / [Mol]Enzym[1]
natives Enzym	380	750	2750	3,95
Behandlung mit Jodazetamid	340	740	2400	3,49
Behandlung mit Chlorazetat	–	610	1875	3,31
Gelchromatographie (Sephadex G25fine)	–	477	1470	3,31

[1] Tetramer (MW 84000)

Tabelle 1o: Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit Chlorazetat nach Jodazetamidvorbehandlung (Methode s.a. 3.2.8.4.)

Während der Gelfiltration auf Sephadex G-25 cochromatographierten Protein und Selen im Ausschlußvolumen.

Daraus wird geschlossen, daß die selenhaltige Komponente des Enzyms durch Chlorazetatbehandlung nicht in niedermolekularer Form freigesetzt wird.
Von dem carboxymethylierten Enzym wurden UV-Absorptionsspektren

1. sofort nach Elution von Sephadex G-25
2. nach 2-tägigem Stehen an der Luft bei Raumtemperatur

aufgenommen. Die Abb.12 zeigt, daß nach Stehen an der Luft Veränderungen des Spektrum im Bereich zwischen 220 und 280 auftreten.

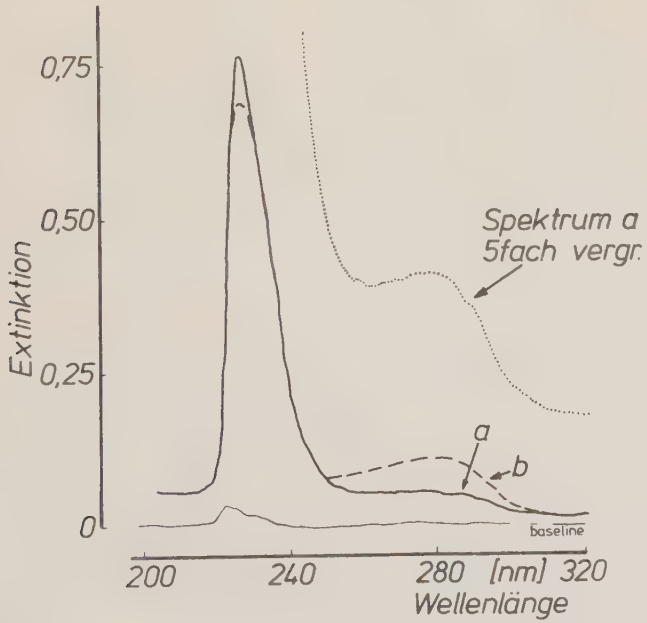


Abb.12: UV-Absorptionsspektren von carboxymethylierter Glutathionperoxidase
(a) unter anaeroben Bedingungen nach Elution von Sephadex G-25
(b) nach 2-tägigem Stehen an der Luft bei Raumtemperatur
Proteinkonzentration: 0.04 mg/ml
Referenzlösung: 0.1 M MOPS-Puffer pH 7.3

Die gleiche Probe wurde auf einen Ammoniumhydrogenkarbonatpuffer umgesalzen und das in Abb.13 dargestellte Röntgenphotoelektronenspektrum aufgenommen.

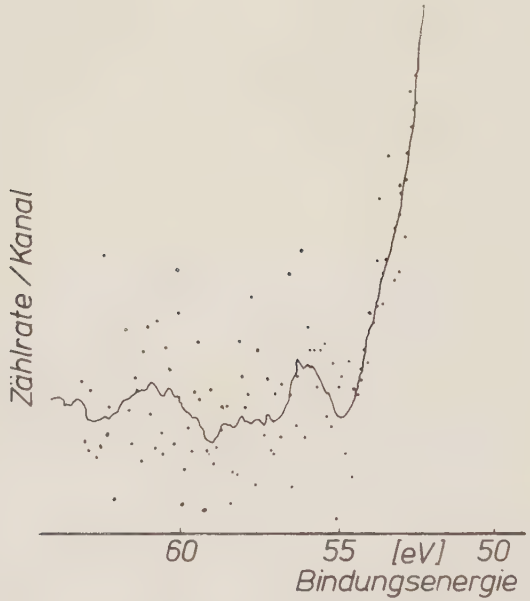


Abb.13: Röntgenphotoelektronenspektrum von carboxymethylierter Glutathionperoxidase
Röntgenstrahlquelle: Mg-Anode mit einer Verlustleistung von 1.1 kW (11 kV;1oo mA)
Workfunction: 6 eV
Analysatorenergie: 1oo eV
Sweep: Weite 3oeV ; Zeit 2o sec
Anzahl der Scans: 1oo
Kurvenanpassung über 25 Punkte

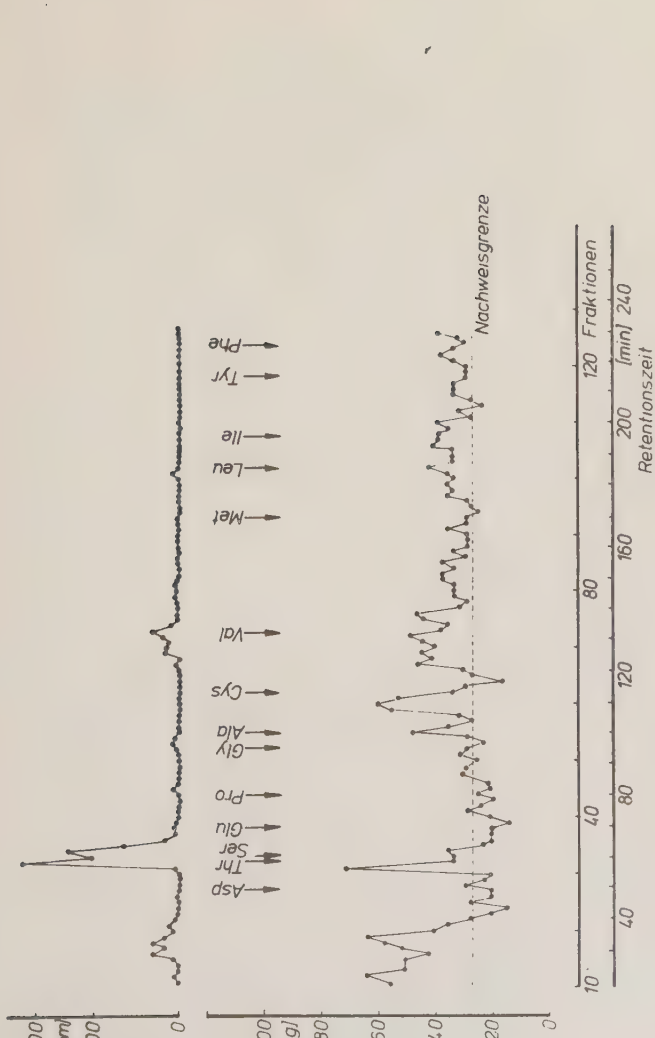


Abb.14: Aminosäureanalyse des sauren Totalhydrolysats von carboxymethylierter Glutathionperoxidase (Aminosäureanalysatorsystem s.a. 3.2.8.5.)
oberer Teil: Verteilung der 14-C-markierten Produkte
unterer Teil:Verteilung der selenhaltigen Produkte

4.6.5. Totalhydrolysen von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

4.6.5.1. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase mit 1-^{14}C-Chlorazetat

Glutathionperoxidase wurde nach Reduktion mit Kaliumtetraboranat direkt mit radioaktiv markiertem Chlorazetat umgesetzt. Nach Abtrennung des überschüssigen Reagenzes wurden in der Probe Proteingehalt, Selengehalt und gebundene Radioaktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß alles eingesetzte Selen und sämtliches Protein im Ausschlußvolumen der Sephadex G-25 Säule mit einer Radioaktivitätsmenge cochromatographiert, die einer Relation von 1.17 Mol Reagenz pro Molekül Selen entspricht.
Dieser Wert weicht leicht von dem unter 4.6.1. genannten ab, doch muß in Rechnung gestellt werden, daß das verwendete Enzym nur noch eine spezifische Aktivität von 158 U/mg hatte und der spezifische Selengehalt bei 2.7 Mol Selen/Mol Tetramer lag.
Die Probe wurde je zur Hälfte der sauren und der enzymatischen Hydrolyse zugeführt.

4.6.5.2. Saure Totalhydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

Während der sauren Hydrolyse traten hohe Verluste an Aminosäuren (ca. 7o%), an Selen (ca.7o%) und an Radioaktivität (ca.4o%) auf. Das Totalhydrolysat wurde im Aminosäureanalysator aufgetrennt. In den erhaltenen Fraktionen wurden Selen und Radioaktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb.14 dargestellt. Die dort markierten Positionen der bekannten Aminosäuren wurden in einem analytischen Lauf bestimmt.
Die Fraktionen 31 und 33 des präparativen Laufes wurden in einem von SILBERNAGL entwickelten Aminosäureanalysator rechromatographiert. Das Auftreten von Produkten, die mit o-Phthaldialdehyd reagieren, ist in Abb. 15 in Abhängigkeit von der Retentionszeit darge-

stellt. Zum Vergleich wurde auch eine Probe von Se-carboxymethylselenocystein, welches nach der in 3.2.9.1. gegebenen Methode dargestellt worden war, chromatographiert.

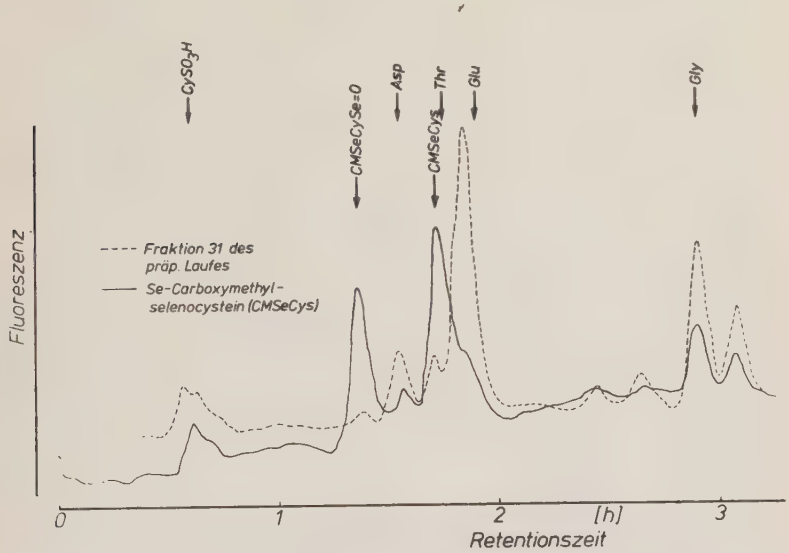


Abb.15: Mikroaminosäureanalyse von Carboxymethylselenocystein und Fraktion 31 des präparativen Laufes (Abb.14) des sauren Totalhydrolysats von Glutathionperoxidase

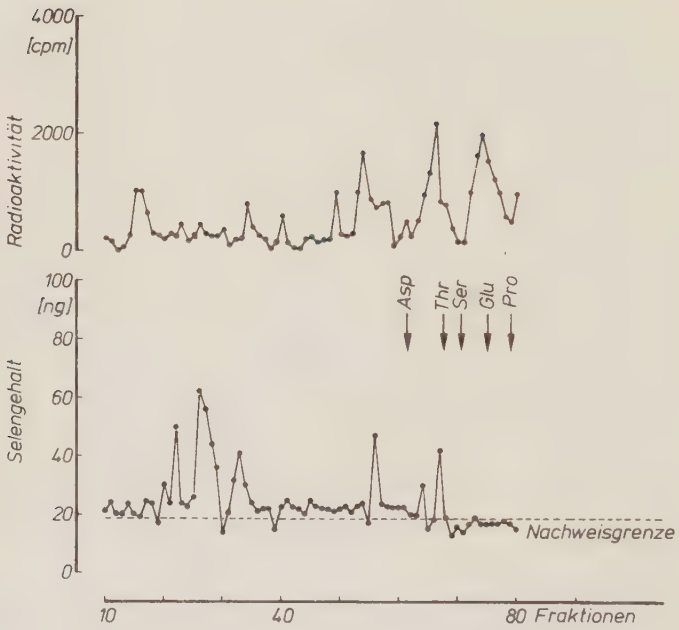


Abb.16: Aminosäureanalyse des enzymatischen Hydrolysats von carboxymethylierter Glutathionperoxidase (Aminosäureanalysatorsystem s.a. 3.2.7.5.)
oberer Teil: Verteilung der ^{14}C-markierten Produkte in Abhängigkeit von der Fraktionsnummer (Retentionszeit)
unterer Teil: Verteilung der selenhaltigen Produkte in Abhängigkeit von der Fraktionsnummer (Retentionszeit)

4.6.5.3. Enzymatische Hydrolyse von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

Die Aminosäureanalyse zeigt, daß die verwendete Mischung proteolytischer Enzyme nicht geeignet ist, modifizierte Glutathionperoxidase vollständig zu hydrolysieren. Das Ergebnis eines präparativen Laufes, der in Abb.16 dargestellt ist zeigt, daß in noch stärkerem Maße als bei der sauren Totalhydrolyse oxidierte Schwefel- und Selenverbindungen mit sehr kurzen Retentionszeiten im Hydrolysat enthalten sind.

4.6.5.4. Carboxymethylierung von Referenzsubstanzen mit Chlorazetat

Verschiedene Seleno- und Schwefelaminosäuren wurden wie in 3.2.8.5. beschrieben mit Chlorazetat modifiziert. Die Zusammensetzung der Produkte wurde mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht. Die Retentionszeiten der ninhydrinpositiven Produkte sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Ninhydrinpositive .Carboxymethylierungsprodukte von	Retentionszeit [min]
Selenocystein	20,34,54
Selenomethionin	60,65
Cystein	36,42
Methionin	23,47,58

Tabelle 11: Retentionszeiten der ninhydrinpositiven Carboxymethylierungsprodukte von verschiedenen Schwefel- und Selenoaminosäuren im Aminosäureanalysatorsystem nach 3.2.8.8.

5. D I S K U S S I O N

5.1. Zur Bestimmung von Selen in organischem Material

Bei der Bestimmung von Selen in organischem Material unterscheidet man zwei Methoden [67]:

1. die nichtdestruktiven Methoden, z.B. die Neutronenaktivierungsanalyse
2. die destruktiven Methoden.

Bei den destruktiven Methoden geht man davon aus, organisch gebundenes Selen durch Veraschung der organischen Matrix in eine Form zu überführen, die es gestattet, das Element direkt mit physikalisch-chemischen Methoden [67] oder nach Umsetzung mit geeigneten Reagenzien quantitativ zu bestimmen.

Aufbauend auf Untersuchungen von WATKINSON [55] hat sich zur Bestimmung von Selen in organischem Material eine fluorometrische Methode [68] durchgesetzt, die auf der Umsetzung des Selens in der Oxidationsstufe +4 mit 2,3-Diaminonaphthalin zu einem in Cyclohexan extrahierbaren Piazselenol [69] beruht. Diese Verbindung kann fluorometrisch bestimmt werden.

Das von WATKINSON [55] und anderen Autoren [68] verwendete Aufschlußverfahren der selenhaltigen Proben mit konzentrierter Salpetersäure und konzentrierter Perchlorsäure ist für den normalen Laborgebrauch aufgrund seiner unberechenbaren Neigung zu Explosionen nur wenig geeignet.

Das in 3.2.3. beschriebene Verfahren benutzt einen Druckaufschluß der Proben mit konzentrierter Salpetersäure und konzentriertem Wasserstoffperoxid, einer weit weniger brisanten Mischung. Folgeprodukte der Salpetersäure, die zur Oxidation von Diaminonaphthalin führen, müssen im hier beschriebenen Verfahren nicht durch Abrauchen entfernt werden. Durch Anpassung der Menge der Aufschlußreagenzien an die Menge der aufzuschließenden Substanz wurden Störeffekte minimiert. Ebenso vermeidet der hier vorgestellte Druckaufschluß die Bildung von Selen der Oxidationsstufe +6, sodaß der von einigen

Autoren [55,70] geforderte Reduktionsschritt ebenfalls entfällt.
Als ein zusätzlicher Reinigungsschritt wurde die Extraktion des selenhaltigen Aufschlusses mit Cyclohexan eingeführt. So konnte z.B. bei der Aufarbeitung stark chloridhaltiger Proben (Mineralwässer) entstandenes Chlor extrahiert werden. Die Extraktion mit Cyclohexan bewirkt zusätzlich eine erhebliche Senkung des Reagenzienblindwertes. Letzteres führt zusammen mit der Verkleinerung der Ansatzvolumina um den Faktor 5 gegenüber der von WATKINSON [55] beschriebenen Methode zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze auf 5 ng (65 pmol).
Eine Verbesserung des Verfahrens erscheint denkbar, wenn man das entstandene Piazselenol durch analytische Flüssigchromatographie von ebenfalls fluoreszierenden und in Cyclohexan extrahierbaren Oxidationsprodukten des Diaminonaphthalins trennt und mittels eines Fluoreszenzdetektors identifiziert und quantifiziert.

5.2. Probleme der Isolierung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten im halbtechnischen Maßstab

Das wohl größte technische Problem bei der Isolierung von Glutathionperoxidase aus Erythrozyten stellt die geringe Konzentration des Enzyms (20 mg/l) in den Erythrozyten und deren hoher Hämoglobingehalt (160 g/l) dar. Dieses hat zur Folge, daß auf den ersten Stufen der Isolationsprozedur sehr große Volumina zu bewältigen sind. Es ist zwar wie von SMITH et al. [71] beschrieben möglich, z.B. bei Ratten die Gesamtaktivität an Glutathionperoxidase durch Supplementation mit Selenomethionin zu steigern, doch nahrungsmittelrechtliche Bestimmungen erlauben die Applikation der benötigten hohen Selendosen bei Schlachttieren nicht. Da das verwendete Blut ausnahmslos von Schlachttieren stammte, mußte auf letztere Möglichkeit verzichtet werden.
Es verblieb also nur eine technologische Verbesserung der Methode. Durch den Einsatz kontinuierlicher Verfahren wurden die ersten Schritte der Isolierung zeit-,

material- und personalsparend gestaltet.
Die bisher vorgenommene Separation und Waschung der Erythrozyten durch diskontinuierliche Zentrifugation [18] wurde durch den Einsatz eines kontinuierlich arbeitenden Separators vereinfacht und verkürzt. Waren bei der diskontinuierlichen Methode drei Waschgänge erforderlich, so erlaubt die hohe Trennqualität des Separators den Verzicht auf zwei Waschgänge.
Das aus den Erythrozyten gewonnene membranfreie Hämolysat muß zur Adsorption an DEAE-Sephadex-A-50 zunächst von Salzen befreit werden. Dieses geschah bisher durch Gelfiltration an Sephadex G-50 coarse [18]. Die Säule mit einem Bettvolumen von 100 l konnte maximal 10 l des Hämolysats entsalzen. Dieser Schritt dauerte jeweils fast einen Tag.
Durch den Einsatz von Hohlfaserdialysatoren mit einer wirksamen Oberfläche von 2.5 m^2 und deren Parallel- und Hintereinanderschaltung konnten die Flußleistung und der Grad der Entsalzung in weiten Bereichen den benötigten Leistungen (Flußleistung ca. 500 ml/min; Dialysefaktor f= 10; erreichte Leitfähigkeit= Leitfähigkeit des Leitungswassers) angepaßt werden.
Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Dialyse und die Konzentration von Glutathionperoxidaselösungen nur in Gegenwart eines nichtionischen Detergenz,z.B. Triton X-100, möglich ist. Aufgrund seiner hohen Affinität zu hydrophoben Membranen wird das Enzym ansonsten unter Inaktivierung irreversibel an die Fasermaterialien adsorbiert.
Nachdem der Hauptteil des Hämoglobins durch Ionenaustauschchromatographie abgetrennt worden ist, kann wie unter 3.2.4.4. beschrieben eine weitere Reinigung durch den Einsatz des makroretikulären Adsorbers XAD-8 erzielt werden. Dieser Schritt hat den Vorteil, daß er entweder über einen Konzentrationsschritt als Vorstufe zu einer Gelchromatographie an Sephadex-G-150 oder direkt zur Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit dienen kann.

Eine Vergrößerung der Ausbeute an Glutathionperoxidase wird dadurch erzielt, daß die verwendeten Lösungen mit recht hohen Konzentrationen an Reduktionsmitteln, z.B. Mercaptoäthanol (1%) versetzt werden. Die Oxidationsempfindlichkeit ist ein Charakteristikum aller Selenoproteine, die bisher in reiner Form isoliert wurden [49,5o]. Sie ist bis zu einem gewissen Grade reversibel, solange wie noch kein Zerfall entstandener seleniger Säuren unter Elimination von Selenwasserstoff und rotem Selen erfolgt ist. Aus diesem Grunde muß auch die Lagerung von Glutathionperoxidase im gefriergetrockneten Zustand in Anwesenheit eines Reduktionsmittels erfolgen.

Insgesamt gesehen ist das unter 3.2.4. beschriebene Verfahren wesentlich zeit- und personalsparender als die von FLOHÉ et al. [18] beschriebene Methode. Eine weitere Verbesserung des Verfahrens ließe sich durch den Einsatz unkonventioneller Präparationstechniken erzielen. Zwar ist, wie Vorversuche gezeigt haben, von der Affinitätschromatographie an immobilisierten Substraten oder Substratanalogen kaum ein Fortschritt zu erwarten, doch bietet die gruppenspezifische Affinitätschromatographie an dem immobiliserten Sulfhydrylreagenz p-Chlormercuribenzoat neue Aspekte.

5.3. Reduktive Behandlung von Glutathionperoxidase

Aufgrund der Befunde von CHIU et al. [63] war angenommen worden, daß starke reduzierende Agenzien wie Natriumdithionit und Natriumtetraboranat geeignet sind, die selenhaltige Komponente aus dem Proteinverband zu eliminieren. Beide Substanzen zeigen unter der Voraussetzung, daß der pH-Wert im Bereich zwischen pH 7-9 gehalten wird, auch in hohen Konzentrationen keinen inhibierenden Effekt auf Glutathionperoxidase. Im Gegenteil wird mit Natriumdithionit eine leichte Aktivierung des Enzyms beobachtet. Die Tetraboranate zeigen dieses Verhalten nicht. Eine Eliminierung des Selens sollte unter der Voraussetzung, daß die selenhaltige Komponente für die enzymatische Aktivität des Proteins verantwortlich ist,

nicht erwartet werden. In der Tat kann in zuvor mit Kaliumtetraboranat behandeltem carboxymethyliertem Enzym durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie und durch fluorometrische Selenbestimmung Selen nachgewiesen werden.
Zu beachten sind jedoch die Änderungen im UV-Absorptionsspektrum der Glutathionperoxidase nach Reduktion mit Tetraboranaten im Bereich von 220-300 nm. Das beim nativen Enzym vorhandene Tal bei 250 nm verschwindet durch Erhöhung der Extinktion bei dieser Wellenlänge. Die beobachtete Änderung kann sowohl auf das Auftauchen eines R-Se-R - Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei 250 nm [72] oder eines $R\text{-}Se^{-}$-Chromophors im Bereich zwischen 243-250 nm [73] zurückzuführen sein. Zusätzlich muß in Rechnung gestellt werden, daß das Auftauchen des beobachteten oxidationsempfindlichen Chromophors auch auf Konformationsänderungen von Tyrosinyl- und Tryptophanylresten im Proteinverband zurückzuführen sein kann [74].

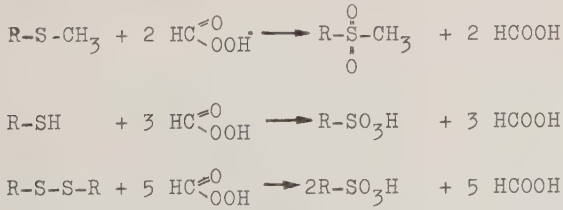
5.4. Denaturierung von Glutathionperoxidase in Gegenwart starker Reduktionsmittel

Unter der Voraussetzung, daß die selenhaltige Komponente von Glutathionperoxidase konformationsstabilisiert gebunden ist, müßte sie, nachdem evtl. zusätzlich stabilisierende S-Se- oder Se-Se-Bindungen gespalten sind, unter denaturierenden Bedingungen freisetzbar sein.
Natriumdodecylsulfat erscheint für diese Aufgabe als das geeignete Reagenz, da es erwiesenermaßen zur Dissoziation der tetrameren Glutathionperoxidase in ihre Untereinheiten führt [18].
Aus Abb.7 ist ersichtlich, daß die Behandlung mit Natriumdodecylsulfat unter den hier angegebenen Bedingungen nicht zur Elimination einer niedermolekularen selenhaltigen Komponente wohl aber zu einer vollständigen Dissoziation in Untereinheiten führt. Es darf somit ausgeschlossen werden, daß die selenhaltige Komponente kon-

formationsstabilisiert an das Protein gebunden ist. Die Frage der enzymatischen Aktivität dieser Untereinheiten kann nicht eindeutig entschieden werden, da SDS an das Protein gebunden bleibt und sehr schwierig aus seiner vorwiegend ionischen Bindung an Proteine zu lösen ist [75].
Aus diesem Grunde wurden zusätzlich Experimente zur Denaturierung mit 6 M Harnstoff unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Harnstoff überführt Proteine in die "Random-coil"-Konformation[76], nach Entfernung des denaturierenden Agenz wird bei den meisten Proteinen die native Konformation wiederhergestellt [77]. Glutathionperoxidase läßt sich nach den in 4.4.2. dargelegten Befunden zu 80-100% renaturieren, wenn man den Harnstoff durch Gelchromatographie oder Dialyse entfernt. Dieses Ergebnis muß als Indiz dafür gewertet werden, daß die selenhaltige Komponente im Proteinverband verbleibt.

5.5. Die Oxidation von Glutathionperoxidase mit Perameisensäure und die Freisetzung der Oxidationsprodukte der selenhaltigen Komponente durch Totalhydrolyse

Perameisensäure wird durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid mit einem Überschuß an Ameisensäure bei niederer Temperatur erhalten [59]. Das so gewonnene Reagenz ist als sehr starkes Oxidationsmittel geeignet, Sulfhydryl-, Disulfid- und Thioäthergruppen nach folgenden Reaktionsgleichungen zu oxidieren:



Alle Reaktionen verlaufen für die Schwefelverbindungen quantitativ, die Oxidationsprodukte sind wesentlich stabiler als die Ausgangsverbindungen. Wird der Schwefel durch sein Isologes Selen ersetzt, so steigt zwar die Reaktivität bezüglich der Oxidation, doch über die Stabilität der Produkte liegen widersprüchliche Befunde vor. HUBER und CRIDDLE [78] stellen die Stabilität der z.B. aus Selenocystein entstehenden Selenocysteinsäure gegenüber saurer Hydrolyse in Frage. Die Oxidation von Selenocystin führte unter den in 3.2.7.2. angegebenen Bedingungen zu einem ninhydrinpositiven Reaktionsprodukt, welches, nach seiner Retentionszeit im verwendeten Aminosäureanalysatorsystem beurteilt, Selenocysteinselenige Säure (R-SeOOH) sein kann. Diese Substanz ist aber weder unter den Bedingungen der sauren noch der enzymatischen Hydrolyse stabil und führt zu mehreren Oxidationsprodukten mit Retentionszeiten von 20-35 min. Ähnliches wurde für Selenomethionin beobachtet.
Wird statt der Referenzsubstanzen oxidierte Glutathionperoxidase hydrolysiert, so finden sich ninhydrinpositive, selenhaltige und nicht-selenhaltige Oxidationsprodukte, die denen des Selenocystins gleichen. Da beide selenhaltigen Peaks zusammen nur 10% des eingesetzten Selens enthalten, muß die Aussagekraft dieser Experimente eingeschränkt werden.
Die Koinzidenz zwischen Selengehalt und positiver Ninhydrinreaktion ist auch für Produkte der enzymatischen Hydrolyse gegeben, welche bei den oben angegebenen Retentionszeiten eluiert werden. Hier wurde jedoch bezüglich der Ausbeute an Selen ein wesentlich besseres Ergebnis erzielt, ca. 30% des eingesetzten Selens wurden in den betreffenden ninhydrinpositiven Peaks wiedergefunden. Die Verluste an Selen traten bei den enzymatisch gewonnenen Hydrolysaten erst während der Aminosäureanalyse in Erscheinung. Ein solches Verhalten erscheint aufgrund der Ergebnisse von HUBER und CRIDDLE [78] verständlich: Derivate der Selensäure und der selenigen Säure können

unter Bildung der im Chromatogramm identifizierten Aminomalonsäure (Retentionszeit:28 min)[79], Pyruvat, Alanin, usw. zerfallen.

5.6. Zur Modifizierung von Glutathionperoxidase mit Halogenessigsäurederivaten

5.6.0. Zum Problem des Arbeitens mit Selenverbindungen der Oxidationsstufen -1 und -2

Bevor die einzelnen Befunde der chemischen Modifizierung der selenhaltigen Komponente diskutiert werden, erscheint ein Exkurs in die Besonderheiten der Reaktivität der in Frage kommenden Selenverbindungen angemessen. In der isologen Reihe der Wasserstoffverbindungen der Chalkogene nimmt mit steigender Periodenzahl die Oxidationsempfindlichkeit zu. Zählen Hydroxylverbindungen (Hydroxide und Alkohole) zu den recht beständigen Verbindungen bei Raumtemperatur und atmosphärischer Luft in neutraler Lösung, so oxidieren Sulfhydrylverbindungen schon recht schnell (Halbwertszeit ca. 1h) unter diesen Bedingungen. Dieses ist die Ursache der guten Reduktionseigenschaften von Thiolverbindungen, wie Mercaptoäthanol, Cystein, etc..
Selenole als Isologe mit einer noch höheren Periodenzahl oxidieren noch um ein Vielfaches schneller.
Nimmt man als Vergleich noch die Reihe der Äther

$$R_1\text{- (Chalk) - } R_2$$

hinzu, so steigt die Oxidationstendenz in der gleichen Weise vom Sauerstoff zum Selen. Da die Oxidationsbeständigkeit der Äther ein wenig größer ist als die der Verbindungen vom Typ R - (Chalk) - H sind auch Selenoäther, z.B. das Selenomethionin, ein wenig stabiler gegen Oxidation als Selenole, z.B. das Selenocystein. Die beschriebenen Eigenschaften haben zur Folge, daß Selenole und Selenide (Selenoäther) nur unter streng anaeroben Bedingungen, bei möglichst niedriger Temperatur in Abwesenheit jedweder Oxidationsmittel zu handhaben sind. Da diese Bedingungen nur schwer über die

gesamte Dauer von Modifizierungsexperimenten mit anschließender Totalhydrolyse aufrechtzuerhalten sind, muß bei allen folgenden Experimenten davon ausgegangen werden, daß die selenhaltige Komponente in ihrer modifizierten Form nur anhand des Musters ihrer Oxidationsprodukte identifiziert werden kann.
Um die modifizierte selenhaltige Komponente selbst zu isolieren, müßten folgende Bedingungen realisiert werden:

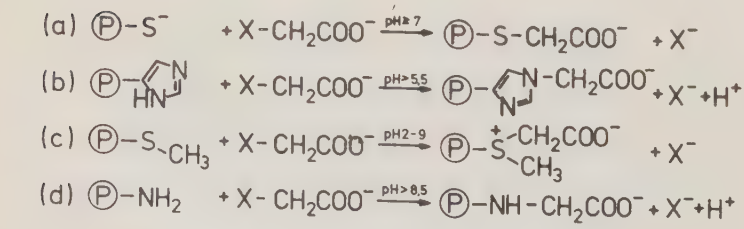
1. Für alle Stufen muß ein vollständig anaerobes Arbeiten gewährleistet sein.
2. Auf allen Stufen müssen starke Reduktionsmittel wie Kaliumtetraboranat, anwesend sein, da schon Disulfidbindungen mit Seleniden oder Selenolen reagieren können [8o].
3. Alle Prozeduren insbesondere Hydrolysen müssen in kürzest möglicher Zeit durchführbar sein.

5.6.1. Die Bindung von Halogenessigsäurederivaten an Glutathionperoxidase

Halogenessigsäurederivate der allgemeinen Struktur

$$X - CH_2 - C\overset{O}{<_Y}$$

in denen X das Halogen und Y entweder eine Hydroxyl- oder eine Aminogruppe repräsentiert, reagieren je nach Wahl der Reaktionsbedingungen mit verschiedenen Aminosäureresten von Proteinen [81]:



Die Reihenfolge der Reaktivität bezüglich der Abgangseigenschaften der Gruppe X

$$J > Br > Cl \gg F$$

ist für alle Typen von Modifizierungsreaktionen gültig. Die Reagenzien werden meistens als Azetate oder Säureamide eingesetzt. Beide Reagenztypen sind in ihrer Reaktivität annähernd gleich, sofern Sulfhydrylgruppen umgesetzt werden. Es sei zusätzlich angemerkt, daß Methioninreste von Glutamatdehydrogenase mit Jodazetamid nicht reagieren [82].

Von allen klassischen nukleophilen Gruppen eines Proteins ist die Sulfhydrylgruppierung in ihrer dissoziierten Form bei weitem die reaktivste. Sie wird nur im Falle der Selenoproteine von Selenolgruppen übertroffen, deren Nukleophilie so groß ist, daß sie auch aus dem undissoziierten Zustand heraus reagieren [78]. Zusätzlich ist bei Papain [83] und bei einer bakteriellen Proteinase [84] beobachtet worden, daß die Sulfhydrylgruppen des aktiven Zentrums besser mit Haloazetaten reagieren als die übrigen Nukleophile, z.B. auch freies Glutathion. Unter Berücksichtigung dieser Befunde können die in 4.6.1. dargelegten Ergebnisse als Stöchiometrie der Bindung von Haloazetatderivaten an das katalytische Zentrum des Enzyms in seinem nativen Zustand gewertet werden. Da Jodazetamid nur mit harnstoffdenaturiertem Enzym reagiert, muß die Bindung dieses Reagenzes an anderen erst im denaturierten Zustand akzessiblen Gruppen erfolgen. Dieser Schluß wird gestützt durch den Befund, daß Jodazetamid im Gegensatz zu Jod- und Chlorazetat das Enzym nicht inhibiert [39].

Durch einen Kontrollversuch wurde gezeigt, daß Chlorazetat in der Tat mit dem aktiven Zentrum des Enzyms reagiert: Glutathionperoxidase, deren Selen durch Cyanidvorbehandlung entfernt worden war, reagierte nicht mehr mit Chlorazetat.

Aufgrund der Überlegung, daß vier Grammatome Selen in vier Untereinheiten des Enzyms vier katalytische Zentren bilden, hätte man erwartet, daß vier Grammoleküle

des jeweiligen Reagenzes mit einem Mol des Tetramers reagieren. Stattdessen wurde nur eine halb so große Stöchiometrie gefunden. Möglicherweise führt die Reaktion auch zu einem instabilen Produkt, z.B. einem Carboxymethylselenoniumsalz . Das beim Zerfall freigesetzte, in diesem Falle markierte Hydroxyazetat erscheint dann in der Gelchromatographie zusammen mit anderen niedermolekularen Produkten.

5.6.2. Carboxymethylierung von Glutathionperoxidase durch Behandlung mit Chlorazetat

Wie die Abbildungen 1o und 11 zeigen, sind die zur vollständigen Inhibition der Glutathionperoxidase notwendigen Chlorazetatkonzentrationen um den Faktor 5o größer als bei Jodazetat. Durch logarithmische Transformation der Ordinaten konnten die Inhibitionskurven linearisiert werden. Die Kinetik ist wegen der hohen Konzentration des Reagenzes (d[Reagenz]= o) pseudo-erster Ordnung. Es darf geschlossen werden, daß eine Modifizierung des Proteins der Form

$$E_{Se-R} \longrightarrow E_{Se-CM}$$

erreicht wird.
Die in 4.6.4. dargelegten Selenbilanzen zeigen, daß die vollständige Inhibition des Enzyms nicht mit einer Eliminierung des Selens in Form niedermolekularer Verbindungen einhergeht. Trotz der Entfernung des überschüssigen Reagenzes durch Gelchromatographie kann die enzymatische Aktivität des Enzyms nicht wiederhergestellt werden. Dieses muß ebenfalls als ein Nachweis einer spezifischen Bindung an das katalytische Zentrum oder an zur Erhaltung der nativen Konformation essentielle Strukturelemente gewertet werden.

5.6.3. Spektroskopische Untersuchungen an carboxymethylierter Glutathionperoxidase

Das UV-Absorptionsspektrum von carboxymethylierter Glutathionperoxidase unterscheidet sich wie in Tabelle 12

dargestellt vom Spektrum des nativen Enzyms durch Veränderung der aus den Absorptionen bei 28o nm und 25o nm zu bildenden Quotienten vom nativen Enzym.

Enzymspezies	$\frac{E\,280}{E\,250}$
nativ	2,6
carboxymethyliert reduziert	1,4
carboxymethyliert partiell oxidiert	1,6

Tabelle 12:Quotienten der Absorptionen bei 28onm und 25o nm für natives und carboxymethyliertes Enzym

Zur Interpretation der spektroskopischen Befunde sind folgende nicht alternative Möglichkeiten zu berücksichtigen:

1. durch das Entstehen eines Selenid-(Selenoäther)-chromophors steigt nach Carboxymethylierung der Absorptionskoeffizient bei 25o nm [72], nach Oxidation an der Luft steigt die Absorption im Bereich zwischen 263-3o2 nm durch Entstehen eines Selenoxids [85]:

$$R_1\text{-Se-}R_2 \xrightarrow{[O]} R_1\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{\text{Se}}\text{-}R_2$$

2. Die Carboxymethylierung bewirkt Konformationsänderungen des Proteinmoleküls, die sich im UV-Spektrum durch Änderung der Absorptionseigenschaften von Phenol- und Indolchromophoren äußert.

Beide Interpretationsmöglichkeiten haben ihre Berechtigung, da die Modifizierung der selenhaltigen Komponente sicherlich Störungen in der betroffenen Mikroumgebung hervorruft, die zu Änderungen des Absorptionsspektrums führen.

Die Abhängigkeit der spektralen Veränderungen vom Oxidationszustand des Enzyms stellt jedoch einen guten Hinweis darauf dar, daß die Änderungen im Spektrum ihre Ursache in einem oxidationsempfindlichen Chromophor haben. Als weiteres Indiz für den Erfolg der Modifizierung der selenhaltigen Komponente ist das Röntgenphotoelektronenspektrum von chlorazetatbehandelter Glutathionperoxidase heranzuziehen. Die Bindungsenergie der 3d 3/2, 5/2 -Elektronen des Selens in reduzierter nativer Glutathionperoxidase beträgt 54.4 eV. Nach Oxidation mit Peroxiden findet man einen Wert von 58 eV [41]. In carboxymethylierter Glutathionperoxidase findet man eine Bindungsenergie von 56 eV. Carboxymethylselenocystein, welches durch Umsetzung von Chlorazetat mit Selenocystein unter sehr gut anaeroben Bedingungen gewonnen wurde, zeigt bei sofortiger Messung ein Signal bei 55 eV. Die Verbindung oxidiert wie aus dem einen Tag später aufgenommenen Röntgenphotoelektronenspektrum hervorgeht unter Verschiebung des Signals zu einer Bindungsenergie von 56.8 eV. Die Aminosäureanalyse der betreffenden Lösung zeigt mehrere ninhydrinpositive Produkte mit Retentionszeiten, die Oxidationsprodukten des Carboxymethylselenocysteins entsprechen.
Der Schluß erscheint gerechtfertigt, daß die selenhaltige Komponente von Glutathionperoxidase im Laufe der langwierigen Modifizierungsprozedur und der Abtrennung des überschüssigen Reagenzes durch Gelchromatographie bereits partiell oxidiert ist.

5.6.4. Hydrolysen und Aminosäureanalysen von carboxymethylierter Glutathionperoxidase

Die saure Hydrolyse führt in der Aminosäureanalyse zu einer Anzahl selenhaltiger Fraktionen, von denen drei die Hauptmenge des Selens und Radioaktivität enthalten. Die Retentionszeiten der drei Produkte entsprechen denen von Carboxymethylselenocystein, Carboxymethylselenocysteinselenoxid und - selenon. Bedauerlicherweise ist das ver-

wendete Aminosäureanalysatorsystem nicht in der Lage, aufgrund der Reaktion mit Ninhydrin zwischen den in der Glutathionperoxidase vorhandenen 65-66-Aspartylresten und den angenommenen 4 Selenoaminosäureresten zu diskriminieren. Diese Entscheidung wurde durch Rechromatographie der selenhaltigen Fraktionen im Mikroaminosäureanalysator von SILBERNAGL [6o] und der Reaktion mit o-Phthaldialdehyd gefällt. Die Fraktionen 31 und 33 lieferten das gleiche Chromatogramm wie Carboxymethylselenocystein und dessen bereits vorhandene Oxidationsprodukte..

Trotz der hohen Verluste an Selen während der sauren Hydrolyse können Überlegungen über die Natur der selenhaltigen Komponente angestellt werden. Aufgrund der Befunde der Aminosäureanalysen kommt als Ausgangsverbindung nur Selenocystein in Frage.

Die enzymatische Methode, die zur Totalhydrolyse von perameisensäureoxidierter Glutathionperoxidase erfolgreich eingesetzt wurde, verlief mit carboxymethyliertem Enzym nicht quantitativ. Selen wurde im Aminosäureanalysator zusammen mit Radioaktivität nur bei Retentionszeiten gefunden, die oxidierten Produkten entsprechen. Aus letzterer Tatsache muß im Zusammenhang mit den bereits oben geschilderten Befunden zur Stabilität von Carboxymethylselenocystein gegenüber Spuren von Sauerstoff geschlossen werden, daß während der mehr als 96 h dauerenden Hydrolyseprozedur trotz extremer Vorsichtsmaßnahmen genügend Sauerstoff mit dem Enzym in Berührung kam, um die modifizierte selenhaltige Komponente zu oxidieren.

5.7. Vorstellungen zur chemischen Natur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase

Im folgenden soll versucht werden, die zuvor diskutierten Ergebnisse auf ihre Konvergenz hin zu untersuchen und daraus eine Vorstellung über die chemische Natur der selenhaltigen Komponente zu formulieren:

1. Die selenhaltige Komponente ist kovalent an das Enzymmolekül gebunden (4.4. und 5.4.)
2. Die selenhaltige Komponente liegt im nativen Zustand des Proteins in einer partiell oxidierten Form

   $$R - Se - OH \text{ oder } R - Se \lesssim \begin{matrix} O \\ OH \end{matrix}$$

   vor, die durch Behandlung mit Tetraboranaten in ein stark oxidationsempfindliches Chromophor überführt werden kann (4.3.2.).
3. Die selenhaltige Komponente ist im reduzierten Zustand durch Behandlung mit Halogenazetaten in definierter Stöchiometrie modifizierbar. Nach Elimination der selenhaltigen Komponente wird kein Reagenz an das Enzym gebunden (4.6.1,2,4).
4. Das Hydrolysat von perameisensäureoxidierter Glutathionperoxidase enthält die gleichen Oxidationsprodukte, die auch bei gleicher Behandlung aus der Aminosäure Selenocystin entstehen. (4.5.)
5. Die carboxymethylierte selenhaltige Komponente und ihre selenhaltigen und ninhydrinpositiven Oxidationsprodukte verhalten sich in der Aminosäureanalyse wie die Referenzsubstanz Se-carboxymethylselenocystein und daraus durch Oxidation entstehende Produkte (4.6.5.3.) Die Beteiligung von Oxidationsprodukten wird zusätzlich durch Ergebnisse der Röntgenphotoelektronenspektroskopie belegt (4.6.4.).

Aufgrund dieser Befunde wird als selenhaltige Komponente die Aminosäure Selenocystein gefordert.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Ein Verfahren zur Isolierung reiner Glutathionperoxidase im halbtechnischen Maßstab unter Einsatz kontinuierlicher Zentrifugations- und Ultrafiltrationstechniken wurde entwickelt und mehrfach erfolgreich durchgeführt.
2. Eine fluorometrische Methode zur Bestimmung von Selen in organischen Materialien mit einer Erfassungsgrenze von 5 ng (± 2o %) wurde erarbeitet. Die Methode ist für den Routinebetrieb zum Durchsatz großer Probenmengen geeignet und zeigt wenig Anfälligkeit gegenüber Störfaktoren (hohe Chloridkonzentration in der Probe).
3. Zur Aufklärung der chemischen Natur der selenhaltigen Komponente wurde das Enzym mit reduzierenden, denaturierenden, oxidierenden und alkylierenden Reagenzien umgesetzt. Reduziertes und alkyliertes Enzym wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie und der Röntgenphotoelektronenspektroskopie untersucht.
   Die Stöchiometrie der Bindung von Halogenessigsäurederivaten (Chlorazetat, Jodazetat und Jodazetamid) wurde bestimmt. Der Verlauf der Inhibition von Glutathionperoxidase durch Chlorazetat in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und von der Inhibitorkonzentration wurde untersucht.
   In den Hydrolysaten von oxidierter und ^{14}C-carboxymethylierter Glutathionperoxidase wurden ninhydrinpositive, bzw. o-Phthaldialdehyd-positive und selenhaltige , radioaktive Produkte nachgewiesen, die auch bei entsprechender Behandlung von Selenocystein entstehen.
4. Aus den vorgelegten Befunden wird geschlossen, daß Glutathionperoxidase als selenhaltige Komponente Selenocystein enthält.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

[1] MILLS, G.C. (1957) J.Biol.Chem. 229 , 189-197

[2] MILLS, G.C. (1959) J.Biol.Chem. 234 , 5o2-5o6

[3] COHEN, G. und P.HOCHSTEIN (1963) Biochemistry 2, 1420-1428

[4] LITTLE,C. und P.J. O'BRIEN(1968) Biochem.Biophys. Res.Comm. 31, 145-150

[5] HALLIWELL,B. (1974) New Phytolog. 73, 1o75-1o86

[6] LOSCHEN, G. (1975) Dissetation Tübingen

[7] BOVERIS,A., OSHINO,N. und B.CHANCE (1972) Biochem.J. 128 , 617-63o

[8] LOSCHEN,G., AZZI,A., RICHTER,C. und L.FLOHE (1974) FEBS lett. 42, 68 72

[9] COON,M.J., STROBEL,H.W., HEIDEMA,J.K., KASCHNITZ,R.M., AUTOR,A.P. und D.P. BALLOV in SCHULTZ,J. und B.F. CAMERON eds., (1972) "The Molecular Basis of Electron Transport, Vol IV" Academic Press, New York, London

[1o] SARIF,G.S. und S.KIRKWOOD (1958) J.Biol.Chem. 233, 1o9-115

[11] MEAD,J.F. und G.M. Levis (1963) J.Biol.Chem. 238, 1634-1636

[12] OSHINO,N., OSHINO,R. und B.CHANCE (1973) Biochem.J. 131, 555-567

[13] HASTINGS,J.W. (1966) Curr.Top.Bioenerg. 1, 113-152

[14] Mc CORD,J.M., BEAUCHAMP, C.O., GOSCIN,S., MISRA, und J.FRIDOVICH (1973) in KING, T.E., H.S.MASON und M.MORRISON, "Oxidases and Related Redox Systems, Vol I" University Park, Press, Baltimore 51-76

[15] WESER,U. (1973) Structure and Bonding 17, 1-64

[16] RICHTER,C., WENDEL,A., WESER,U. und A.AZZI (1975) FEBS Lett. 51, 3oo.3o3

[17] FLOHÉ,L., SCHLEGEL,W. und E.SCHAICH (197o) Z.klin. Chem.klin.Biochem. 8, 149-155

[18] FLOHÉ,L., EISELE,B. und A.WENDEL (1971) Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 352, 151-158

[19] FLOHÉ,L. (1969) Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 35o, 856-858

[2o] FLOHÉ,L., SCHAICH,E., VOELTER,W. und A.WENDEL (1971) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 17o-18o

[21] FLOHÉ,L., GÜNZLER,W., JUNG,G., SCHAICH,E. und F. SCHNEIDER (1971) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 159-169

[22] GÜNZLER,W.A., VERGIN,H., MÜLLER,J. und L.FLOHÉ (1972) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.353, 1oo1-1oo4

[23] FLOHÉ,L. und J.BRAND (1969) Biochem.Biophys.Acta 191, 541-549

[24] FLOHÉ,L., LOSCHEN,G., GÜNZLER,W. und E.EICHELE (1972) Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353,987-999

[25] FREDGA,A. (1972) Ann.N.Y. Acad.Sci. 192, 1-9

[26] JÀUREGUI-ADELL,J. (1966) Adv.Prot.Chem. 21, 387-445

[27] FRANKE,K.W., (1934) J.Nutr., 8, 597-6o8
J.Nutr., 8, 6o9-613

[28] FRANKE,K.W., (1936) Cereal Chem. 13, 67-7o

[29] FRANKE,K.W., und E.P. PAINTER (1935) J.Nutr. 1o, 599-611

[3o] NIGAM,S.N. und W.B. Mc CONNELL (1973) Phytochemistry 12, 359-362

[31] NIGAM,S.N. und W.B. Mc CONNELL (1969) Biochem.Biophys.Acta. 192, 185-19o

[32] TRELEASE,S.F., DI SOMMA,A.A. und A.C. JACOBS (1960) Science 132, 618

[33] VIRUPAKSCHA,T.K. und A.SHRIFT (1963) Biochem.Biophys.Acta 74, 791-793

[34] SCHWARZ,K. und C.M.FOLTZ (1957) J.Amer.Chem.Soc. 79, 3292-3293

[35] SCHWARZ,K., BIERI,J.G., BRIGGS,G.M. und C.M.SCOTT (1957) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 95, 617-620

[36] ROTRUCK,J.T., HOEKSTRA,W.G. und A.L. POPE (1971) Nature New Biol. 231, 223-224

[37] ROTRUCK,J.T., POPE,A.L., GANTHER,M.E., SWANSON,A.B., HAFEMAN,D.G. und W.HOEKSTRA (1973) Science 179, 588-590

[38] FLOHÉ,L., GÜNZLER,W.A. und H.H.SCHOCK (1973) FEBS Lett. 32, 132-134

[39] GÜNZLER,W.A., (1974) Dissertation Tübingen

[4o] FLOHÉ,L., GÜNZLER,W.A. und R.LADENSTEIN (1976) in ARIAS,I.M. und W.B.JACOBY, "Glutathione, Metabolism and Function", Raven Press, New York

[41] WENDEL,A., PILZ,W., LADENSTEIN,R., SAWATZKI,G. und U.WESER (1975) Biochem.Biophys.Acta 377, 211-215

[42] WESER,U., G.SOKOLOWSKI und W.PILZ (1977) J.Electr. Spectroscop. and Rel.Phenomena 429-439

[43] PINSENT,J. (1954) Biochem.J. 57, 1o-16

[44] SHUM,A.C. und J.C.MURPHY (1972) J.Bacteriol. 1o1, 447-449

[45] STADTMAN,T.C., ELLIOTT,P. und L.TIEMANN (1958) J.Biol.Chem. 231, 961-973

[46] T.C.STADTMAN, (1962) Arch.Biochem.Biophys.99,36-44

[47] T.C.STADTMAN, (1966) Arch.Biochem.Biophys.113,9-19

[48] D.C.TURNER und T.C.STADTMAN (1973) Arch.Biochem. Biophys. 154, 366-381

[49] CONE,J.C., DEL RIO,R.M., DAVIS,J.N. und T.C.STADTMAN (1976) Proc.Natl.Acad.Sei. U.S.A. 73, 2659-2663

[5o] CONE,J.C., DEL RIO,R.M. und T.C.STADTMAN (1977) J.Biol.Chem. 252, 5337-5344

[51] GÜNZLER,W.A., KREMERS,H. und FLOHÉ,L. (1974) Z.klin. Chem.klin.Biochem. 12, 444-448

[52] FLOHÉ,L. und I.BRAND (197o) Z.klin.Chem.klin.Biochem. 8, 156-161

[53] LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L. und R.J.RANDALL (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275

[54] HEINZEL,W. (196o) Verh.Deut.Ges.Innere Med. 66, 636

[55] WATKINSON,J.H. (1966) Anal.Chem 38, 92-97

[56] TÖLG,G. (197o) Naturwiss. 63, 99-11o

[57] NBS-Vorschrift Officical Methods of Analysis (197o) 11^{the} ed. AOAC, Washington,D.C.

[58] MAURETTE,J.M. (1973) Patentschrift 7322931, Paris

[59] HIRS,C.H.W. (1956) J.Biol.Chem. 219, 611-621

[6o] SILBERNAGL,S. und E.BAYLIS Microchimica Acta (z.Veröffentlichung eingereicht)

[61] MARCO,C., RINALDI,A., DESSI,M.R. und S.DERNIM (1976) Moll.Cell.Biochem. 12, 89-92

[62] MEANS,G.E. und R.E. FEENEY (1971) Chemical Modification of Proteins, 15o Holden-Day,Inc.San Francisco

[63] CHIU,D., FLETCHER,B., STULTS,F., ZATKOWSKI,J. und A.TAPPEL (1975) Fed.Proc. 34, 925

[64] WENDEL,A. und B.KERNER (1977) Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 358, 1296

[65] PRONASKA,J.R., OH,S.H., HOEKSTRA,W.G. und H.E.GANTHER (1977) Biochem.Biophys.Res.Comm. 74, 64-71

[66] LADENSTEIN,R. (1975) Diplomarbeit Tübingen

[67] OLSON,O.E., PALMER,I.S. und E.I. WHITEHEAD (1973) Methods of Biochemical Analysis Vol. 21, 39-78

[68] OLSON,O.E., PALMER,I.S. und E.E.CARY (1975) Journal of AoAc 58, 117-121

[69] PARKER,C.A. und L.G. HARVEY (1962) Analyst 87, 558-565

[7o] GRANT,A.B. (1963) New Sealand J.Sci. 6, 577-588

[71] SMITH,P.J., TAPPEL,A.L. und C.K. CHOW (1974) Nature 247, 392-397

[72] BOGOLYUBOW, G.M. und YU,N.SHLYK (1969) Zh,Obshch.Khim. 39, 1759

[73] KURDER,J.E. (1973) in Organic Selenium Compounds (D.E. Klayman and W.H.H.Günther, eds) p 866 Wiley & Sons, New York

[74] GRAUPE,K.A. (1978) Diplomarbeit Tübingen

[75] WEBER,K. und D.J. KUTTER (1971) J.Biol.Chem. 246, 45o4-45o9

[76] SIMPSON,R.B. und W.KAUZMANN (1953) J.Am. Chem. Soc. 75, 5139-5152

[77] WHITE,F.H.,Jr. (1961) J.Biol.Chem. 236, 1353-136o

[78] HUBER,R.E. und R.S.CRIDDLE, (1967) Asch.Biochem.Biophys. 122, 164-173

[79] SCHOBERL,A. und P. RAMBACHER (1939) Ann. 538, 84

[8o] W.H.H.GÜNTHER, (1967) J.Org.Chem. 32, 3931-3933

[81] MEANS,G.E. und R.E. FEENEY (1971) Chemical Modification of Proteins p 1o5 Holden- Day,Inc.San Francisco

[82] DAVID,M., RASCHID,I.R. und H.SUND, (1976) Eur.J. Biochem. 74, 379-385

[83] SLUYTERMAN,L.A.E. (1968) Biochem.Biophys. Acta 151,178-187

[84] GERWIN,B.I. (1967) J.Biol.Chem. 242, 451-456

[85] KLAYMAN,D.E. und W.H.H.GÜNTHER, Org. Selenium Compounds (1973) 2o9

L E B E N S L A U F

Am 8.Mai 1946 wurde ich als erster Sohn des Polsterer- und Dekorateurmeisters Bernhard Kerner und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Mäusl, in Bielefeld geboren. Ostern 1952 wurde ich in die Fröbelschule zu Bielefeld eingeschult und wechselte 1956 in die Kuhlo-Realschule zu Bielefeld über, die ich nach der Mittleren Reife 1962 verließ. Während des Schuljahres 1962/1963 besuchte ich den Aufbauzug des Max-Planck-Gymnasiums zu Bielefeld.

In der Zeit von Mai 1963 bis Dezember 1963 arbeitete ich bei der Aachener- und Münchener- Feuer-Versicherungsgesellschaft in Bielefeld als Bürohilfskraft. Am 2. Januar 1964 trat ich als Praktikant in das Pharmakologische Laboratorium der ASTA-Werke in Brackwede ein und wurde am 1.April 1964 als Biologielaborantenlehrling übernommen. Im Oktober 1967 legte ich nach 3 1/2 jähriger Lehrzeit die Gehilfenprüfung als Biologielaborant ab.

Von November 1967 bis Januar 197o besuchte ich das Westfalen-Kolleg zu Bielefeld und legte dort am 10.Januar die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 197o begann ich das Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Ich bestand die Diplomhauptprüfung nach dem Sommersemester 1974 und arbeitete von November 1974 bis August 1975 im Physiologisch-chemischen Institut unter der Anleitung von Dr. Albrecht Wendel an meiner Diplomarbeit mit dem Thema "Affinitätschromatographische Verfahren zur Trennung von Glutamat-abhängigen Enzymen."

Von Oktober 1975 bis Februar 1978 führte ich die Untersuchungen zu meinem Dissertationsprojekt "Die chemische Natur der selenhaltigen Komponente von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten" unter der Anleitung von Universitäts-Dozent Dr. Albrecht Wendel durch.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G.Weitzel, U.Weser, L.Flohé
Anorganische Chemie	W.Rüdorff
Organische Chemie	E.Müller, E.Bayer
Physikalische Chemie	H.Mauser
Anatomie	K.Mörike
Histologie	M.Arnold
Zoophysiologie	F.P.Möhres
Toxikologie	H.Remmer
Mathematik	E.Pracht
Physik	H.Krüger
Botanik	F.W.Bentrup
Mikrobiologie	H.Zähner
Zoologie	F.P.Möhres

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321